

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Dermatologie

Die Rolle des entzündungsassoziierten Gefahrensignals
High Mobility Group Box 1 (HMGB1)
in der Immunpathogenese der Psoriasis vulgaris

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Lisa Anna Strohbücker
aus Essen
2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Körber

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Ch. Specker

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. U. Mrowietz

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2018

Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Bergmann, C., Strohbiecker, L., Lotfi, R., Sucker, A., Joosten, I., Koenen, H., Koerber, A. (2016). High mobility group box 1 is increased in the sera of psoriatic patients with disease progression. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 30, 435-441.

Strohbiecker, L., Bergmann, C., van Rijssen, E., van Cranenbroek, B., Fasse, E., Joosten, I., Koenen, H., Koerber, A. (2017). Interaction of HMGB1 and RAGE is involved in the Th17 shift in Psoriasis vulgaris. *Plos One*. Submitted

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Krankheitsbild der Psoriasis vulgaris	6
1.2	Das Verständnis der Pathogenese der Psoriasis vulgaris und die Entwicklung zielgerichteter Therapien	7
1.3	T Zellen im Immunsystem.....	10
1.4	Das Gefahrensignal High Mobility Group Box 1	12
1.5	Die Rolle von HMGB1 in Autoimmunerkrankungen.....	14
1.6	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	14
2	Material	16
2.1	Chemikalien.....	16
2.2	Puffer und Lösungen	16
2.3	ELISA	17
2.4	Immunhistochemie	17
2.5	Antikörper.....	18
2.6	Geräte und andere Materialien	18
2.7	Patientenmaterial	19
3	Methoden	22
3.1	Isolation und Behandlung humaner Immunzellen	22
3.1.1	Dichtezentrifugation von peripherem Blut.....	22
3.1.2	Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer	22
3.1.3	Aufarbeitung und Lagerung von Patientenseren	23
3.1.4	Auftauen von PBMCs	23
3.2	Entnahme der Hautproben	24
3.3	Durchflusszytometrie.....	24
3.3.1	Oberflächenfärbung.....	24
3.3.2	Intrazelluläre Färbung	25
3.4	ELISA	25

3.5	Immunhistochemie	26
3.6	Statistische Analysen	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Bestimmung der Konzentration von HMGB1 und verschiedener Interleukine im Serum und in der Haut	28
4.1.1	HMGB1, IL-23 und TGF- β im Serum	29
4.1.2	HMGB1, IL-17 und CD3 in der Haut	36
4.2	Phänotypisierung der Immunzellen aus dem Blut	41
4.2.1	Der Transkriptionsfaktor ROR γ t und der CCR6- und IL-23 Rezeptor als Marker für Th17 Zellen	42
4.2.2	Die Expression der Rezeptoren RAGE, TLR2 und TLR4	45
5	Diskussion	47
6	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis	53
	Abkürzungsverzeichnis	58
	Abbildungsverzeichnis	59
	Tabellenverzeichnis	60
	Anhang	61
	Danksagung	62
	Lebenslauf	63

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis vulgaris ist eine systemische, chronisch-entzündliche, autoimmun-vermittelte Systemerkrankung der Haut und der Gelenke. Die Prävalenz für Psoriasis liegt bei 2-3% in der deutschen Bevölkerung, was einer Anzahl von 1,6-2 Millionen Betroffenen allein in Deutschland entspricht (Nestle et al., 2009). Damit gehört sie zu den häufigsten entzündlichen Dermatosen im Praxisalltag von Dermatologen (Gerdes et al., 2012). 85-90% der Menschen, welche an Psoriasis erkrankt sind, leiden an der Unterform der Psoriasis vulgaris (Griffiths et al., 2007).

Es werden vom klinischen Verlauf zwei Typen der Psoriasis vulgaris unterschieden. Etwa 75% der Erkrankten sind dem Typ 1 zuzuordnen. Bei diesen Patienten tritt die Erkrankung bereits vor dem 40. Lebensjahr auf und es zeigt sich eine familiär-genetische Prädisposition. Der Krankheitsverlauf ist meist schwerwiegender als bei dem Typ 2 und sie neigen deutlich häufiger zu Rezidiven. Der Typ 2-Psoriatischer hingegen, ist in den meisten Fällen bei Krankheitsbeginn bereits älter als 40 Jahre, zeigt stabilere Krankheitsverläufe und hat seltener eine positive Familienanamnese für Psoriasis vulgaris.

Die Prädilektionsstellen befinden sich an den Streckseiten der Extremitäten (siehe Abbildung 1), an der behaarten Kopfhaut, im Gehörgang und an der Rima ani. Klinisch zeigen sich bei den Patienten scharf begrenzte, erythematho-squamöse Plaques mit weiß-silbriger Schuppung. Diese Schuppung entwickelt sich aus einer Hyperproliferation der Epidermis aufgrund einer frühzeitigen Reifung von Keratinozyten. Dies hat zur Folge, dass der Verhornungsprozess des Stratum corneum unvollständig bleibt und die Zellkerne in den Zellen der obersten Hautschicht verbleiben. Durch eine verstärkte Versorgung der Haut mit Blutgefäßen, kommt es neben einer Rötung und Juckreiz zu einem vermehrten Übertritt von Immunzellen in die Plaques.



Abbildung 1: Psoriatische Plaques an der Streckseite der unteren Extremitäten, Quelle: (Health.com, 2017)

Aufgrund des chronischen schubweisen Verlaufs der Erkrankung, der bislang fehlenden Aussicht auf eine definitive Heilung und der Stigmatisierung durch den Befall von exponierten Arealen, wie der Fingernägel oder des Haaransatzes, stellt diese Erkrankung eine hohe psychische Belastung für die Patienten dar. Da es sich nicht um eine alleinige Entzündung der Haut, sondern um systemische Inflammationserkrankung handelt, bestehen weitere potenzielle Komorbiditäten, wie vermehrte myokardiale Ereignisse, Schlaganfälle oder auch das Auftreten eines metabolischen Syndrom mit der Folge einer deutlich erhöhten kardiovaskulären Mortalität (Lee et al., 2014; Y. S. Su et al., 2013). Diese erhöhte Rate an Komorbiditäten hat einen starken Einfluss auf die Gesundheit und Lebensqualität der Patienten und führt zu einer Reduktion der Lebenserwartung von 3-7 Jahren bei Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris (Abuabara et al., 2011; Gelfand et al., 2007).

1.2 Das Verständnis der Pathogenese der Psoriasis vulgaris und die Entwicklung zielgerichteter Therapien

Die ersten dokumentierten Fälle der Psoriasis vulgaris wurden als eine isolierte Erkrankung der Haut beschrieben, welche durch eine beschleunigte Reifung und Hyperproliferation der Keratinozyten, mit daraus resultierender vermehrter Schuppenbildung, erklärt wurde. Somit bestand die Therapie für die Patienten aus einer alleinigen abschuppenden topischen Behandlung mit Cremes und Salben.

Mit stetig zunehmenden Erkenntnissen über die Immunpathogenese, wird die Psoriasis vulgaris in den letzten Jahren als eine autoimmunologisch-vermittelte systemische Inflammationserkrankung gesehen. Aus dieser Überlegung heraus basiert die Therapie der Patienten auf immunsuppressiven und/oder immunmodulierenden Medikamenten, wie beispielsweise Cyclosporin A, Methotrexat oder Fumarsäureester.

Mit der Entdeckung der einzelnen T-Zell-Subpopulationen (siehe Kapitel 1.3) hat sich das Verständnis der Pathogenese der Psoriasis vulgaris in den letzten Jahren stark verändert. Zwar konnte bislang kein auslösendes Antigen für die Initiation der Psoriasis vulgaris gefunden werden, jedoch wird mit zunehmenden Forschungsergebnissen davon ausgegangen, dass der Erkrankung das sogenannte Zytokin-Netzwerk-Modell zugrunde liegt (Nickoloff, 1991; Swindell et al., 2012) (siehe Abbildung 2).

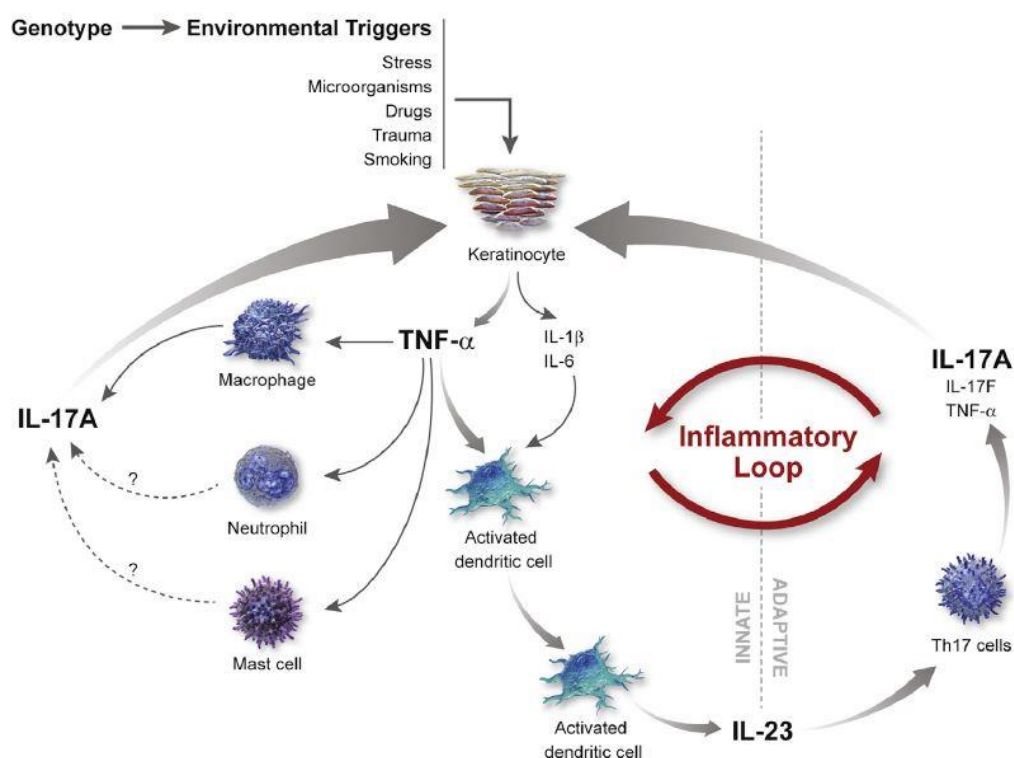


Abbildung 2: Circulus vitiosus der Psoriasis vulgaris, Quelle: (Lynde et al., 2014)

Bei gegebener genetischer Disposition lösen exogene und/oder endogene Stimuli eine Kaskade von Zytokin-abhängigen und zellulären Vorgängen aus, die zu einer inflammatorischen Reaktion führen. Insbesondere Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), der von Dendritischen Zellen und Keratinozyten freigesetzt wird, sowie Interferon γ (IFN γ) von Th1 Lymphozyten und

Interleukin-17 von Th17 Zellen, spielen hierbei eine wesentliche pathogene Rolle (siehe Abbildung 3). Auch die Dys- bzw. Überfunktion von verschiedenen Untergruppen von T Zellen sind wesentlich an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt.

Nachdem Psoriasis vulgaris zunächst als eine Th1-vermittelte Systemerkrankung beschrieben wurde und nach heutigem Wissen durch eine überschießende Antwort der Th17-Zellen entsteht, wurden erste sehr immunologisch-gezielte Therapien entwickelt. Es entstand die große Gruppe der Biologika. Ein Biologikum ist ein biotechnologisch hergestelltes Medikament, das durch einen gezielten Eingriff in körpereigene Funktionen und Mechanismen, das weitere Fortschreiten und die Ausbreitung von krankhaften Vorgängen im Körper verhindert (Langer, 2015). In der Psoriasis vulgaris sind bereits TNF α -Inhibitoren (Infliximab (Remicade ©, MSD Sharp & Dohme GmbH), Adalimumab (Humira ©, AbbVie Ltd) und Etanercept (Enbrel ©, Pfizer), ein IL-12/23-Inhibitor (Ustekinumab (Stelara ©, Janssen-Cilag) und IL17-Inhibitoren (Ixekizumab (Taltz ©, Eli Lilly), Secukinumab (Cosentyx ©, Novartis Pharma GmbH) als Biologika etabliert.

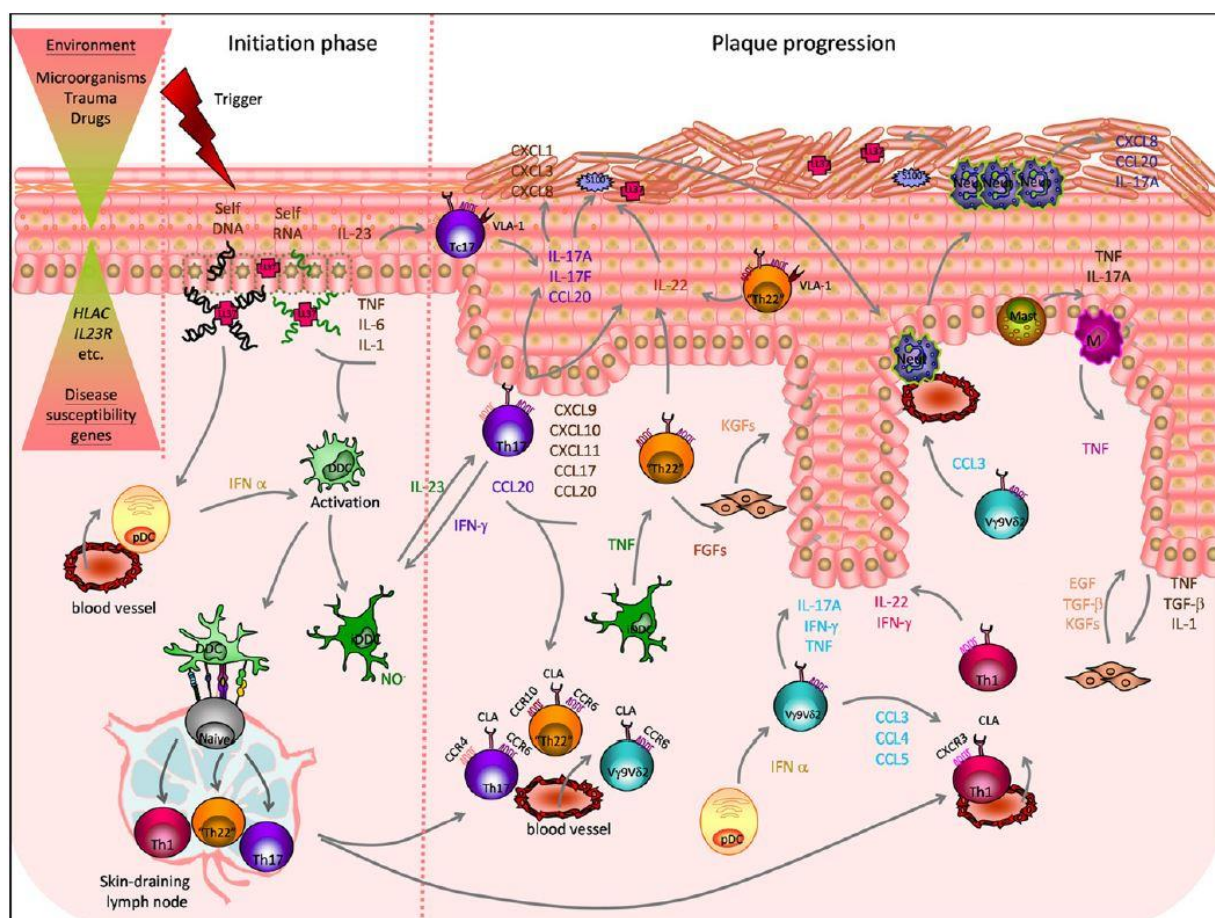


Abbildung 3: Immunpathogenese der Psoriasis vulgaris, Quelle: (Di Meglio et al., 2011)

Neben der Inhibition von einzelnen entzündlichen Botenstoffen wird auch die Blockade von Signalwegen, wie beispielsweise durch JAK-Inhibitoren, in Studien untersucht.

Die Therapiemöglichkeiten werden immer spezifischer und greifen unter anderem in intrazelluläre Prozesse des Immunsystems ein. Wie beispielsweise das neue Medikament Apremilast (Otezla ©, Celgene), ein Phosphodiesterase 4-Inhibitor, welcher das Angebot an intrazellulärem cAMP senkt und für die mittelschwere bis schwere Psoriasis zugelassen ist.

Erst kürzlich wurde eine entscheidende Rolle von dysfunktionellen regulatorischen T Zellen (Tregs) und pro-inflammatorischen Th17 Zellen in der Immunpathogenese der Psoriasis vulgaris entdeckt (Bovenschen et al., 2011). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die in der Psoriasis vulgaris üblicherweise dysfunktionellen Tregs unter pro-inflammatorischen Konditionen rasch in Th17 Zellen differenzieren und diese zu einer weiteren Unterhaltung und Fortschreiten der Erkrankung führen. Diese Differenzierung wurde nach Bovenschen et al v.a. durch das Zytokin Interleukin-23 vermittelt.

Da diese Differenzierung von Tregs zu Th17 Zellen in der rheumatoiden Arthritis und Hepatitis B unter dem Einfluss des Gefahrensignals High Mobility Group Box 1 (HMGB1) beschrieben ist (siehe Kapitel 1.4 und 1.5), sehen wir HMGB1 als einen möglichen Akteur in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris und als einen potenziellen neuen Angriffspunkt für eine gezielte immunmodulatorische Therapie.

1.3 T Zellen im Immunsystem

T Zellen gehören zu dem erworbenen Teil des Immunsystems und entstehen aus naiven T Zellen nach Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen, in den Lymphknoten.

Es werden CD4+, auch T Helferzellen (Th Zellen) genannt, CD8+, auch zytotoxische T Zellen genannt, und regulatorische T Zellen unterschieden.

Die CD8+ T Zellen tragen einen T Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche, welcher über MHC-I Moleküle mit den Zielzellen interagiert. Alle kernhaltigen, körpereigenen Zellen tragen ein MHC-I Molekül und präsentieren über dieses Molekül verschiedene Polypeptide, welche aus intrazellulären Degradationsprozessen entstanden sind. Antigen-präsentierende Zellen sind in der Lage auch extrazelluläre Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und dann MHC-I-abhängig zu präsentieren (Heath et al., 2001). Ihre Zytotoxizität entsteht durch die

Erkennung von Antigenen auf anderen Zellen mit Hilfe der Interaktion des T-Zell-Rezeptors und des MHC-I-Moleküls. Bei dieser Interaktion wird die infizierte Zelle gebunden und eine Apoptose per Granzym-Sekretion aus der CD8⁺ T Zelle eingeleitet (Voskoboinik et al., 2015). Die CD4⁺ T Zellen, werden durch die Antigene auf MHC-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen aktiviert und sezernieren spezifische Zytokine als Aktivierungs- und Proliferationssignale für andere Immunzellen. Bei der antigenspezifischen T-Helfer-Zell-Antwort wird die Th1-, die Th2- und die Th17-Antwort aufgrund ihrer zellspezifischen Zytokinsekretion und Effektorfunktionen unterschieden (Weaver et al., 2007).

Th1 Zellen entstehen aus naiven T Zellen nach Stimulation mit IL-12 und Interferonen, exprimieren den Transkriptionsfaktor Tbet und sezernieren insbesondere IFN- γ (Maggi et al., 2012).

In einem Milieu mit IL-2 und IL-4 entstehen hauptsächlich Th2 Zellen, welche durch GATA3 als Transkriptionsfaktor und die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 definiert werden (Licona-Limon et al., 2013).

Seit ein paar Jahren sind auch die Th17 Zellen bekannt, welchen in der Psoriasis vulgaris eine besondere Rolle zugeschrieben wird. Sie exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ T und sezernieren IL-17 und IL-22, so dass sie ein sehr starkes pro-inflammatorisches Potenzial besitzen (Bettelli et al., 2007) (Stockinger et al., 2007).

Als weitere Gruppe der T Zellen sind die regulatorischen T Zellen (Tregs) von großer Bedeutung. Sie dienen der Suppression des Immunsystems und erhalten somit die Immunhomöostase (Itoh et al., 1999). Tregs können sowohl den CD4⁺ T Helferzellen als auch den CD8⁺ zytotoxischen T Zellen angehören und teilen sich weiter in verschiedene Untergruppen auf (Josefowicz et al., 2012). Da die CD4⁺ Tregs die größere der beiden Gruppen darstellt und sich die vorliegende Arbeit mit CD4⁺ Tregs beschäftigt, wird im Folgenden nur auf diesen Zellsubtyp eingegangen. Sie entsprechen in etwa 5-6% der zirkulierenden CD4⁺ Zellen und sind gekennzeichnet durch eine hohe Expression der IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25) (Baecher-Allan et al., 2001). Als Transkriptionsfaktor exprimieren sie FoxP3, welches jedoch keinen exklusiven intrazellulären Marker für Tregs darstellt. Das Fehlen des Oberflächenmarkers CD127 (IL-7 Rezeptor α -Kette) auf humanen Tregs kann als weitere Identifizierungshilfe herangezogen werden (W. Liu et al., 2006).

In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass die Differenzierung von CD4⁺ T Zellen in die oben aufgeführten Subpopulationen keine endgültige Entwicklung ist, sondern

diese noch einen hohen Grad an Plastizität besitzen. Besonders die FoxP3⁺ regulatorischen T Zellen und die Th17 Zellen können funktionell je nach physiologischer Umgebung verschiedene Immunantworten zeigen. Diese Adaptation kann ein kritischer Faktor, besonders in Autoimmunerkrankungen, darstellen (Kleinewietfeld et al., 2013).

1.4 Das Gefahrensignal High Mobility Group Box 1

Das Protein High mobility group box 1 (HMGB1) wurde vor etwa 30 Jahren als ein DNS-bindendes Protein im Zellkern entdeckt und nach seiner schnellen Mobilität in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese benannt. Strukturell besteht es aus 3 Domänen: den zwei homologen DNA-bindenden Motiven A- und B-Box und dem negativ geladenen C-Terminus (Walker et al., 1980). HMGB1 ist ein nukleäres Protein, welches in allen kernhaltigen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Im Zellkern dient es der Stabilisierung der Nukleosomenformation und als Transkriptionsfaktor (Stros et al., 2002; West et al., 2004). Es ist jedoch auch bekannt, dass HMGB1 als Antwort auf Verletzungen, Infektionen oder entzündlichen Stimuli von aktivierten Makrophagen (Bonaldi et al., 2003; Wang et al., 1999), reifen dendritischen Zellen und natürlichen Killer-Zellen (Semino et al., 2005) sezerniert werden kann. Deshalb wird es zu den Hauptvertretern der Damage associated molecular pattern molecules (DAMPs) oder auch der Alarmine gezählt (Seong et al., 2004; Zeh et al., 2005).

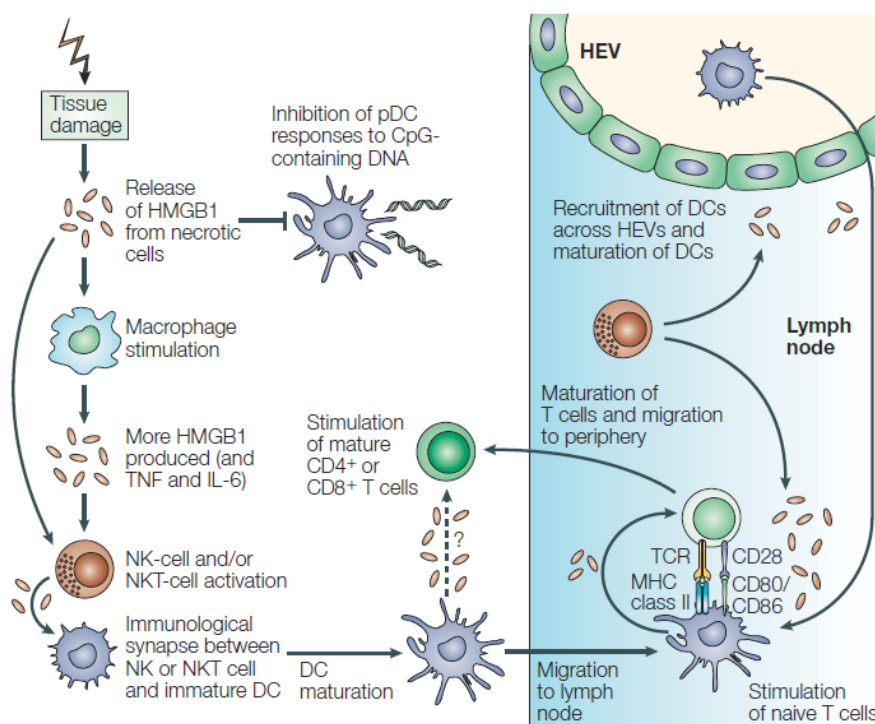


Abbildung 4: HMGB1 im Immunsystem, Quelle: (Lotze et al., 2005)

Wenn diese Proteine in den Extrazellularraum gelangen, signalisieren sie dem Organismus, dass ein Gewebsschaden entstanden ist (Lotze et al., 2007) und übernehmen damit die Funktion eines Zytokins. Zytokine sind Proteine, welche eine Vielzahl metabolischer und immunologischer Antworten verschiedener Zellen vermitteln (Lotze et al., 1985).

Wang et al. zeigte, dass HMGB1 als Zytokin von einer Vielzahl an Zellen sezerniert werden kann (Wang et al., 1999). Wenn HMGB1 im Extrazellularraum vorhanden ist, bindet es an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, zum Beispiel den Receptor for advanced glycation end products (RAGE), den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), und vermittelt über Signalkaskaden und den daraus folgenden Zellantworten eine Chemotaxis von Immunzellen, eine epitheliale und endotheliale Dysfunktion, sowie die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie $\text{TNF } \alpha$ und Interleukin- 1α , und damit eine akute Entzündung (Bustin et al., 1978; Javaherian et al., 1978) (siehe Abbildung 4). Wie auch andere proinflammatorische Zytokine, sind kleine Mengen an HMGB1 fördernd für die angeborene Immunantwort auf Infektionen. Jedoch ab einer Überexpression von 30-300 ng/ml im Serum führt HMGB1 zu einer signifikanten Toxizität (Baker et al., 1976).

1.5 Die Rolle von HMGB1 in Autoimmunerkrankungen

Eine erhöhte Konzentration von HMGB1 im Serum oder auch im Gewebe wurde bereits in verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (Yan Shi et al., 2011), der systemischen Sklerose (Yoshizaki et al., 2009), dem Lupus erythematoses (Popovic et al., 2005; Urbonaviciute et al., 2007) oder auch der Hepatitis C (Li et al., 2014), beschrieben. Jedoch ist bislang unklar, welche genaue Rolle HMGB1 in der Pathogenese dieser einzelnen Erkrankungen spielt.

Für die rheumatoide Arthritis konnten Shi et al. zeigen, dass eine Stimulation mit HMGB1 einen Anstieg an IL-17 produzierenden T Zellen hervorruft (Yan Shi et al., 2011). In Patienten mit Hepatitis C zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der erhöhten HMGB1-Konzentration im Serum und einem verringerten Quotienten von regulatorischen T Zellen zu Th17 Zellen im Blut und in dem hepatischen Mikromilieu (Li et al., 2014). Zudem zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass eine Co-Kultivierung von Serum von Patienten mit weit fortgeschrittener Hepatitis C und von Immunzellen von Patienten in einem frühen Stadium eine verstärkte Expression des Th17-Transkriptionsfaktors ROR γ T und eine gleichzeitige Herabregulierung des Treg-Transkriptionsfaktors FoxP3 hervorruft. Diese Veränderung konnte durch eine Hemmung von Interleukin-6, HMGB1 und dem Toll-like-Rezeptor 4 unterbunden werden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Verschiebung der immunhomöostatischen Balance von anti-inflammatorischen Tregs zu pro-inflammatorischen Th17 Zellen durch HMGB1 hin. Wie bereits in Kapitel 1.2. erwähnt, ist eine derartige Verschiebung auch bereits in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris beschrieben worden, jedoch wird diese bislang dem Interleukin-23 zugeschrieben.

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es die Rolle von HMGB1 in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris zu beschreiben und anhand aktueller Daten genauer zu charakterisieren.

Im ersten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob HMGB1 im Serum und in der Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu gesunden Probanden und zu Patienten unter verschiedenen Standardtherapien erhöht ist. Zur Quantifizierung kommen die Methoden des ELISA und der Immunhistochemie zum Einsatz.

Im zweiten Teil der Arbeit soll dann eine Immunphäotypisierung der verschiedenen Immunzellpopulationen im Blut, mit besonderem Fokus auf die Th17 Zellen und die

regulatorischen T Zellen, mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgen. Zudem sollen auch relevante Oberflächenrezeptoren der Toll-like Rezeptorenfamilie auf den einzelnen T-Zellsubgruppen bestimmt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
HCl	Applichem, Darmstadt, Deutschland (Dtl.)
H ₃ PO ₄	Applichem, Darmstadt, Dtl.
NaOH	Applichem, Darmstadt, Dtl.
Tween 20	GERBU, Heidelberg, Dtl.
Methanol	Merck, Darmstadt, Dtl.
Hematoxylin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Histosafe	Adamas, Utrecht, Niederlande
Tris	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
HCl	Merck, Darmstadt, Dtl.
EDTA	Merck, Darmstadt, Dtl.

2.2 Puffer und Lösungen

Biocoll Separation Dilution	Biochrom AG, Berlin, Dtl.
PBS	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
Elisa Waschpuffer	1x PBS (Gibco by Life technologies, Grand Island, USA) 0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Citrat-Puffer	Dako, Jena, Dtl.
Tris EDTA pH 9	50mM Tris + 2mM EDTA (Gibco by Life technologies, Grand Island, USA)
Tris/AP univ = TBS	Dako, Jena, Dtl.
Tris HCl pH 7,6	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
EDTA pH 8	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
BSA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Normal Swine Serum	Vector, Philadelphia, USA
Normal Horse Serum	Vector, Philadelphia, USA
RPMI 1640	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
Sodium Pyruvat	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
Glutamax	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
Pen/Strep	Gibco by Life technologies, Grand Island, USA
Fix/Perm	eBioscience, San Diego, USA

2.3 ELISA

HMGB1	IBL international, Hamburg, Dtl.
IL23	eBioscience, San Diego, USA
TGFb	eBioscience, San Diego, USA

2.4 Immunhistochemie

ABC Kit (goat,rabbit) Vectastain	Vector, Philadelphia, USA
LSAB (Yellow and Red Drops)	Dako, Jena, Dtl.
Vector Blue substrate Kit	Vector, Philadelphia, USA
Envision+ System HRP labelled Polymer anti rabbit	Dako, Jena, Dtl.
Metal Enhanced Dab substrate Kit	Thermo, Carlsbad, USA
Levamisole/Endogenous Alkaline Phosphatase Inhibitor	Dako, Jena, Dtl.
Stable peroxidase substrate buffer	Thermo, Carlsbad, USA
Liquid Permanent Red Substrate Buffer	Dako, Jena, Dtl.
Liquid Permanent Chromogen	Dako, Jena, Dtl.
Permout	Fisher Scientific, Whitby, USA

2.5 Antikörper

Antigen	Isotyp	Konjugat	Klon	Firma	Verwendung	Verdünnung
CCR6	Maus IgG1k	PE	11A9	BD	FACS	1:50
CD127	Maus IgG1	PE-Cy5	eBioRDR5	eBioscience	FACS	1:50
CD127	Maus IgG1	APC-AF700	R34.34	Beckman Coulter	FACS	1:50
CD161	Maus IgG2a	APC	191B8	miltenyi Biotec	FACS	1:10
CD161	Maus IgG2a	PCB	191B8	Beckman Coulter	FACS	1:25
CD25	Maus IgG1k	PE Cy7	M-A251	BD	FACS	1:50
CD3	Maus IgG1	ECD	UCHT1	Beckman Coulter	FACS	1:25
CD3	Maus IgG1k	APC-AF750	UCHT1	Beckman Coulter	FACS	1:50
CD3	Maus IgG1		F7.2.38	Abcam	Immunhistochemie	1:50
CD4	Maus IgG1	PB	13B8.2	Beckman Coulter	FACS	1:100
CD4	Maus IgG1	PC5.5	13B8.2	Beckman Coulter	FACS	1:200
CD4	Maus IgG1k	FITC	MT310	Dako	FACS	1:50
CD4	Maus IgG2b	PerCP	38261	BioLegend	FACS	1:100
CD45	Maus IgG1	KO	J.33	Beckman Coulter	FACS	1:50
CD45RA	Maus IgG1	ECD	2H4LDH11LDB9	Beckman Coulter	FACS	1:50
CD8	Maus IgG1	APC-AF750	B9.11	Beckman Coulter	FACS	1:400
CD8	Maus IgG1	APC-AF700	B9.11	Beckman Coulter	FACS	1:400
CD8	Maus IgG1k	ECD	SFC121Thy2D3	Beckman Coulter	FACS	1:50
FoxP3	Ratte IgG2a	FITC	PCH101	eBioscience	FACS	1:50 ic
Foxp3	Ratte IgG2a, κ	efluor450	PCH101	ebioscience	FACS	1:50
HMGB1	Hase IgG	PE	polyklonal	Novus Biologicals	FACS/ Immunhistochemie	1:200 ic
IL17	Ziege IgG		rhIL-17	RD systems	Immunhistochemie	1:500
IL-23R	Maus IgG2B	FITC	218213	RD systems	FACS	1:10
RAGE	Ziege IgG		polyklonal	BIOLOGO	FACS	1:100
RORgt	Ratte IgG2a	PE	AKFKJS-9	eBioscience	FACS	1:125 ic
TLR2	Maus IgG2a	Alexa Fluor 488	TL2.1	eBioscience	FACS	1:50
TLR4	Maus IgG2b	PE	HTA125	eBioscience	FACS	1:100

Tabelle 1: verwendete Antikörper

2.6 Geräte und andere Materialien

Zentrifugenröhrchen (50ml + 15ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Dtl.
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Dtl.
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Pasteurpipetten	Biosigma, Cona, Italien
Deckgläser	
Dako Pen	
Axioskop 2 mot plus	Zeiss, Jena, Dtl.
AcioCam MRc5	Zeiss, Jena, Dtl.
Axiovision Rel 4.6	Zeiss, Jena, Dtl.
Zählkammer	Bürker, Marienfeld, Dtl.
96 Well-Platten (V und round)	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.7 Patientenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blut- und Gewebeproben von gesunden Spendern und Patienten mit Psoriasis vulgaris verwendet. Die Spender unterzeichneten nach Aufklärung eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Ein Ethikvotum der hiesigen Ethikkommission liegt vor.

	Anzahl der Patienten	Alter in Jahren, Median	w	m	mit systemischer Therapie
gesunde Kontrollen	21	26,5	12	9	-
Patienten Pasi <5	42	48,4	17	25	27
Patienten Pasi 5,1-15	24	50,7	8	16	12
Patienten Pasi >15	24	47,2	11	13	5

Tabelle 2: Patientenmaterial zur Auswertung der Blutseren

Therapien	Anzahl der Patienten	Alter in Jahren, Median	w	m
IL-12/23-Inhibitoren	6	50,7	2	4
Methotrexat	6	56,5	3	3
TNF α -Inhibitoren	16	48,2	5	11
Fumarsäureester	16	50,4	6	10

Tabelle 3: Systemische Therapien der Patienten

Zur Bestimmung von HMGB1 und der Interleukine TGF- β und IL-23 im Serum wurden insgesamt 111 Blutproben gesammelt und mittels ELISA analysiert (siehe Kapitel 3.4).

Darunter befanden sich 21 gesunde Kontrollen, 42 Patienten mit leichter, 24 Patienten mit mittelstarker und 24 Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris (siehe Tabelle 2). Das Durchschnittsalter der Patienten mit Psoriasis vulgaris lag in der gesamten Kohorte bei 51,7 Jahren. Von den insgesamt 90 Patienten mit Psoriasis vulgaris befanden sich 44 Patienten unter einer systemischen Therapie. Jeweils 6 Patienten nahmen Ustekinumab oder Methotrexat ein und jeweils 16 Patienten standen unter Therapie mit Fumarsäureester oder einem TNF α -Inhibitor (siehe Tabelle 3).

Zur Bestimmung von HMGB1, des CD3-Rezeptors und IL-17 in der Haut wurden 14 Personen rekrutiert. 4 gesunden Kontrollen wurde jeweils eine Hautprobe, sowie 5 Patienten mit leichter und 5 Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris jeweils zwei Hautproben entnommen.

Eine Probe aus einem psoriatischen Hautareal und eine Probe aus nicht betroffener Haut (siehe Tabelle 4 und siehe Kapitel 3.2)

	Anzahl der Patienten	Alter in Jahren, Median	w	m
gesunde Kontrollen	4	22,8	1	3
Patienten Pasi <5	5	47,8	4	1
Patienten Pasi >15	5	42	1	4

Tabelle 4: Patientendaten für die Immunhistochemie

Für die Messung mit Hilfe des Durchflusszytometers (siehe Kapitel 3.3) wurden Blutproben von 10 gesunden Kontrollen, 11 Patienten mit leichter und 11 Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris entnommen. Das Durchschnittsalter der Patienten mit Psoriasis vulgaris liegt in dieser Analyse bei 43,5 Jahren (siehe Tabelle 5).

	Anzahl der Patienten	Alter in Jahren, Median	w	m
gesunde Kontrollen	10	31	4	6
Patienten Pasi <5	11	40,9	4	7
Patienten Pasi >15	11	46	2	9

Tabelle 5: Patientendaten für die Immunzellphänotypisierung

Der Schweregrad der Erkrankung wurde mit Hilfe des Psoriasis Area Severity Index (PASI) bestimmt. Der PASI Score beinhaltet den prozentualen Anteil der von Psoriasis betroffenen Haut, welche in vier Regionen unterteilt wird (Kopf und Hals, obere Extremität, Rumpf und untere Extremität), sowie die Stärke der Rötung, die Dicke der psoriatischen Plaques und die

Schuppung. Leichter Schweregrad wurde definiert als PASI <5, mittelgradig als PASI von 5 bis 15 und schwergradig als Pasi >15.

Die Patienten hatten keine lokale Therapie in den letzten 4 Wochen vor der Blut- und Gewebeanalyse. Eine systemische Behandlung musste 3 Monate vor Einschluss in die Studie beendet worden sein (ausgenommen der Analyse der Serumkonzentrationen).

3 Methoden

3.1 Isolation und Behandlung humaner Immunzellen

3.1.1 Dichtezentrifugation von peripherem Blut

Zur Auftrennung von Blut in Plasma, mononukleäre Zellen, Granulozyten und Erythrozyten wurde die Dichtezentrifugation verwendet.

Das Blut, insgesamt 70 ml, wurde per venöser Punktion in Heparinröhrchen aufgefangen.

Anschließend wurde das Blut im Verhältnis 1:1,6 mit PBS verdünnt. 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll) wurde in vier 50 ml Röhrchen vorgelegt und mit jeweils 35ml der Blut/PBS-Mischung vorsichtig überschichtet.

Die Röhrchen wurden bei 360 rcf für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Zur Isolation der mononukleären Zellen (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) wurde die ringförmige Schicht der PBMCs mit einer Einwegpasteurpipette in drei neue 50 ml Röhrchen geerntet.

Die Röhrchen mit den isolierten Zellen wurden dann auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und dann bei 250 rcf für weitere 10 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation folgte das Abkippen des Überstandes und das Aufklopfen der Zellpellets. Die Zellen aller drei Röhrchen wurden dann in einem 50ml Röhrchen gepoolt. Vor der zweiten Zentrifugation bei 250 rcf für 10 Minuten, wurden 10 µL dieser Zellsuspension für die Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer entnommen.

Nach diesem Waschschrift, wurde ein letztes Mal der Überstand abgekippt und die Zellen in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium wurde zuvor aus 90% FCS und 10% DMSO zusammengesetzt. Pro beschriftetes Einfrier Röhrchen wurden $12\text{--}20 \times 10^6$ Zellen in 1ml Medium aufgenommen und anschließend in die vorgekühlte Einfrierbox gestellt.

Nun wurde die Box in den -80° Gefrierschrank gestellt und nach maximal einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerkammer

Das Zellpellet wurde in einem definierten Volumen von 50 ml PBS gelöst. Von dieser Zelllösung wurden 10 µL abgenommen und in eine 96well Zellkulturplatte pipettiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:2 mit 10 µL Türkis angefärbt. Nachdem das Deckgläschen auf die Neubauerkammer gesetzt wurde, wurden 10 µL der angefärbten Zellsuspension in die

Kammer gefüllt. Die Zellen wurden mit dem 10x Objektiv und 10x Okular in den vier äußeren Quadranten mit jeweils 16 Quadraten ausgezählt.

Die Gesamtzahl der Zellen wurde dann wie folgt errechnet:

Gezählte Zellen aus den äußeren 4 Quadranten geteilt durch die Anzahl der Quadranten multipliziert mit der Verdünnung, mit dem Volumen der Ausgangslösung und mit dem Volumen der Neubauerkammer

Formel: Zellzahl gesamt= gezählte Zellen/4 * Verdünnung (2) * Ausgangsvolumen (50ml) * 10^4 /ml

3.1.3 Aufarbeitung und Lagerung von Patientenseren

Nach Entnahme einer Serummonovette von 7,5ml wurde diese für 10min bei 1000 rcf zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde mit Hilfe einer Pipette in 500 µL Portionen in 1,5 ml Eppendorf Gefäße aliquotiert.

Die Röhrchen wurden mit Patientenummer, Serum und Datum beschriftet und dann bei -20° Celsius in nummerierten Boxen gelagert.

3.1.4 Auftauen von PBMCs

Der Auftauprozess muss sehr schnell ablaufen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei Raumtemperatur zellschädigend wirkt.

Die Zellen wurden aus dem Kryotank oder dem -80°C Gefrierschrank entnommen und in das 37°C warme Wasserbad gestellt. Während des langsamen Auftauprozesses wurden in ein 15ml Röhrchen Raumtemperatur warmes 20ml RPMI 1640, welches mit Penstrep, Glutamax und Sodium Pyruvat + 10% HBC versetzt war, vorgelegt.

Falls in dem PBMC-Tube noch mittig ein wenig Eis zu erkennen war, wurde dies entnommen und vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in das RPMI 1640⁺⁺⁺ überführt und für 5 min bei 450g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt und anschließend wurden die Zellen in 1ml RPMI 1640 gepoolt.

Daraufhin erfolgte eine erneute Zellzahlbestimmung, um das Überleben und die Anzahl der Zellen zu prüfen.

3.2 Entnahme der Hautproben

Es wurde bei Psoriasis Patienten eine Probe aus nicht betroffener und eine Probe aus betroffener Haut am Arm entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass die beiden Areale eine Entfernung von ca. 5cm nicht überschritten. Nach der Desinfektion folgte eine örtliche Betäubung und es wurde eine Probe mit Hilfe eines runden Skalpells aus der Haut gestanzt. Die entstandene Wunde wurde mit einer Naht (Nadel-Faden-Kombination, Stärke 2/0, Monosyn) zur Adaption versorgt.

Die Hautprobe wurde unmittelbar nach der Entnahme in Formalinaldehyd fixiert. Nach 24-48 Stunden Fixierung wurde es in Paraffin gegossen.

Danach wurden 2µm dicke Schnitte an einem Mikrotom angefertigt und auf Objektträger gebracht.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der relativen Quantifizierung bestimmter Zellen und Antigene innerhalb einer Zellsuspension. Das Gerät generiert einen Einzelzellstrahl, in dem jede Zelle separat von einem oder mehreren Lasern erfasst wird. Die gestreuten Lichtstrahlen werden von verschiedenen Detektoren erfasst und definieren Zellgröße (forward scatter, FSC) und Zellgranularität (sideward scatter, SSC). Zusätzlich werden Antikörper verwendet, die definierte Strukturen auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren erkennen. Die Antikörper werden mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt, die von Lasern entsprechender Wellenlänge angeregt werden. Emittiertes Licht wird von Detektoren erfasst und in eine Signalstärke umgewandelt. Zudem wurden Isotyp-Kontrollen durchgeführt, so dass eine unspezifische Bindung aufgrund der Antikörperherkunft ausgeschlossen werden konnte. Für die Analysen in dieser Arbeit wurde das 5-Farben- Durchflusszytometer (FACS) FC500 von Beckman Coulter und das 10-Farben Durchflusszytometer Navios von Beckman Coulter zusammen mit der Kaluza-Software von Beckman-Coulter verwendet.

3.3.1 Oberflächenfärbung

Zur Oberflächenfärbung wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in FCM-Puffer (PBS+ 0,2% BSA) resuspendiert. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz mit den Antikörpern inkubiert. Die eingesetzten Verdünnungen der Antikörper sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Waren die Antikörper unkonjugiert, wurde nach einem Waschschrift ein

zweiter Färbeschritt mit fluorchromgekoppelten Sekundärantikörpern angeschlossen. Dies war jedoch nur bei RAGE (BIOLOGO, Kronshagen, Dtl.) der Fall. Anschließend wurden die Zellen sofort am entsprechenden Durchflusszytometer gemessen oder aber einer Permeabilisierung, für eine intrazelluläre Färbung, zugeführt.

3.3.2 Intrazelluläre Färbung

Zur Detektion intrazellulärer Strukturen, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor FoxP3 oder ROR γ t, mussten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurde der Fix/ Perm Puffer von eBioscience gemäß Bedienungsanleitung verwendet. Nach der Färbung und dem finalen Waschschrift wurden die Zellen unverzüglich am Durchflusszytometer Navios aufgenommen.

3.4 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Zytokinen und generell Proteinen in Lösung, z.B. im Serum, im Plasma oder im Zellkulturüberstand.

Hierzu wird zunächst eine 96-well Mikrotiterplatte mit einem Antikörper beschichtet und über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Nach einem Waschschrift wird dann für eine weitere Stunde ein Assay Diluent hinzugegeben, dessen Funktion darin liegt aus der Beschichtung eine ebene Fläche zu machen.

Anschließend wird die zu untersuchende Lösung auf der Platte für 2 Stunden inkubiert, so dass das Protein vom Antikörper gebunden werden kann. Nach Abwaschen der übrigen Bestandteile, folgt ein weiterer Inkubationsschrift von einer Stunde mit einem zweiten zielgerichteten Detektionsantikörper. An diesen Antikörper kann nach einem weiteren Waschschrift Streptavidin binden, welches mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) konjugiert ist. Nun wird das mit H₂O₂ versetzte Substrat 3,3',5,5"-Tetramethylbenzidin (TMB) aufgetragen. Die Peroxidase spaltet H₂O₂ in OH-Radikale, welche dem TMB ein Elektron entziehen. Das entstandene TMB-Radikalkation besitzt eine blaue Farbe. Durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure wird das Enzym denaturiert und die Reaktion wird abgestoppt. Außerdem färbt sich das TMB-Radikal durch die Protonierung gelb. Die colorimetrische Detektion er

folgt bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 570nm. Eine Standardreihe dient der Quantifizierung der erhaltenen Messergebnisse.

Die ELISAs zur Detektion von HMGB1 (IBL, Hamburg, Dtl.), TGF β und IL23 (eBioscience, Frankfurt, Dtl.) wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Bestimmung verschiedener immunologischer Marker im histologischen Gewebeschnitt, welche mit Hilfe eines Mikroskops sichtbar gemacht werden können. Dieses antikörperbasierte Verfahren wurde genutzt um die Marker HMGB1, IL-17 und CD3 in den gewonnenen Hautbiopsien zu quantifizieren.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern von Paraffin befreit und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurde das Gewebe für eine Zeit zwischen 30 und 60 Minuten in verschiedenen Lösungen, je nach Antikörperfärbung, gekocht. Nach dem Abkühlen erfolgte die Hemmung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid für 15 Minuten und das Gewebe wurde mit Serum geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Daraufhin wurde der Schnitt mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde dann nach dem Waschen je nach Färbung das 3,3'-Diaminobenzidin-Cobalt oder der biotinylierte sekundäre Antikörper mit dem Enzym-markierten Streptavidin auf den Gewebeschnitt pipettiert. Nach dem Waschen erfolgte dann noch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 Minute. Schließlich erfolgte eine erneute Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe des Gewebes und der Schnitt wurde mit einem Deckglas versorgt.

3.6 Statistische Analysen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit der Software Image J. Eine Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der Kaluza Software von Beckman Coulter.

Die endgültigen Rohdaten aller Versuche wurden mittels Graph Pad Prism in Graphen konvertiert.

Bei den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen und der Durchflusszytometrie werden die einzelnen Werte der Patienten als Plots, sowie der Mittelwert mit dazugehörigem

Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels des Mann-Whitney U Tests.

Die Signifikanzschwelle wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

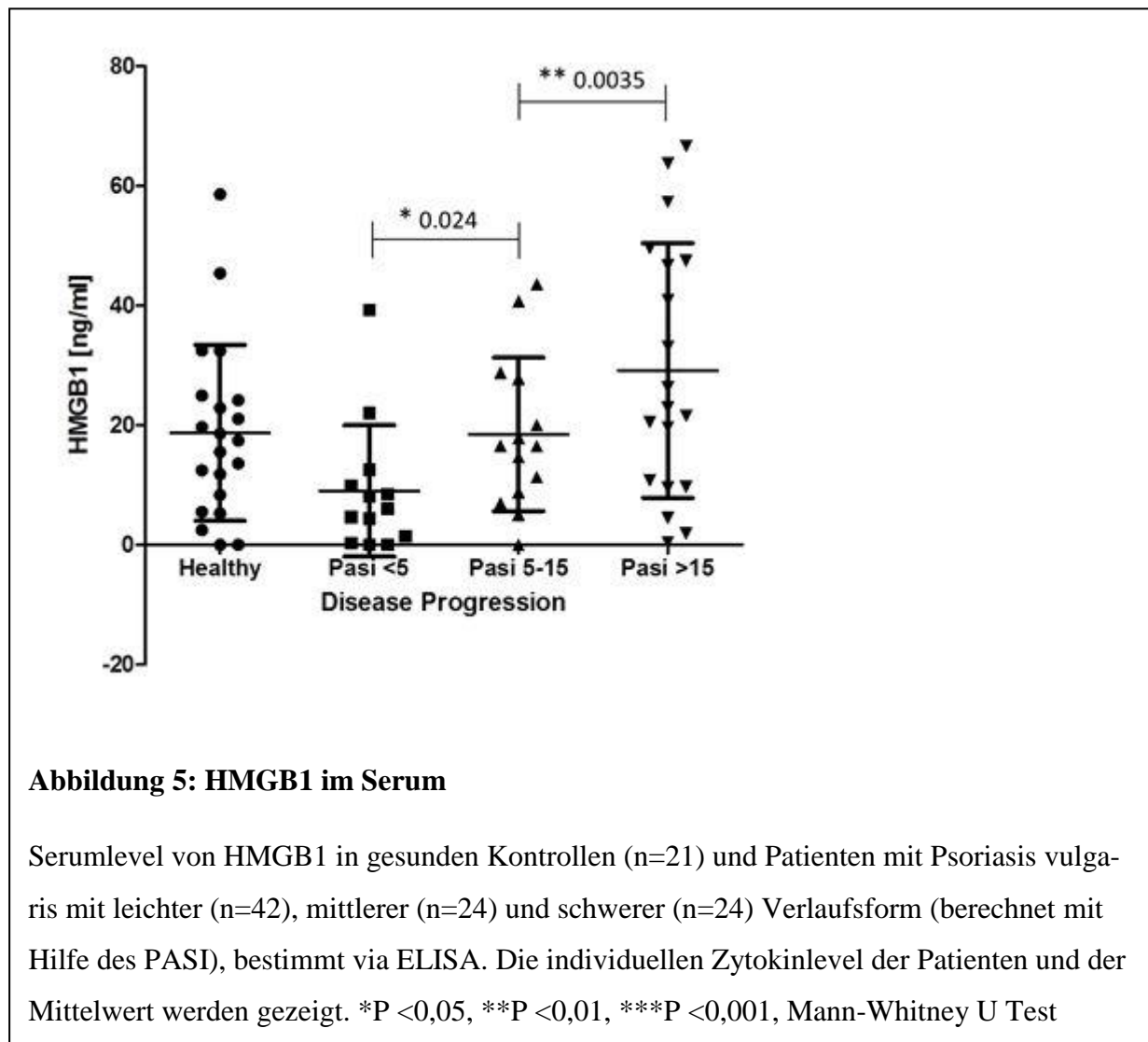
4.1 Bestimmung der Konzentration von HMGB1 und verschiedener Interleukine im Serum und in der Haut

Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob HMGB1 im Serum und in der Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist. Dafür wurden Blutproben von Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Psoriasis vulgaris und von gesunden Kontrollpersonen entnommen. Es wurden ebenfalls Blutproben von Patienten gesammelt, welche sich unter einer der vier Standardtherapien für Psoriasis vulgaris (Fumarsäureester, Methotrexat, TNF α -Inhibitoren oder Ustekinumab) befanden. Somit ist es möglich Patienten mit verschiedenen Schweregraden der Erkrankung und Patienten mit unterschiedlichen Therapiearten zu vergleichen.

Zudem wurden von gesunden Kontrollpersonen eine Hautprobe und von Patienten mit Psoriasis vulgaris zwei Hautproben entnommen. Eine Probe aus einem unbetroffenen Teil der Haut und eine Probe aus einem psoriatischen Plaque (betroffen/ läsional). Somit ist es möglich die Haut mittels Immunhistochemie zu untersuchen.

Als weitere Entzündungsmarker wurden Interleukin-23 und TGF- β im Serum und Interleukin-17 und CD3 in der Haut bestimmt.

4.1.1 HMGB1, IL-23 und TGF- β im Serum



Das Serumlevel von HMGB1 ist in der Gruppe der schweren Psoriatiker im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe erhöht. Der Median der schweren Psoriatiker liegt bei 30 ng HMGB1/ml Serum im Vergleich zu 20 ng HMGB1/ml Serum in der gesunden Kontrollgruppe (siehe Abbildung 5).

Zudem besteht ein Schweregrad-abhängiger Anstieg von HMGB1 im Serum. So zeigt sich in der leichten Patientengruppe eine Konzentration von 10 ng/ml, bei mittlerem Schweregrad eine Konzentration von 20 ng/ml und in der schwergradig betroffenen Patientengruppe ein medianes Level von 30 ng/ml im Serum.

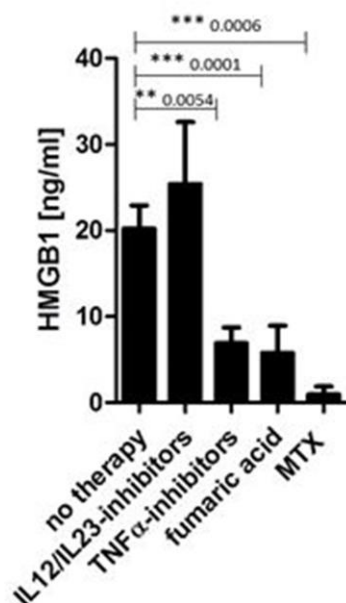


Abbildung 6: HMGB1 im Serum unter verschiedenen Therapien

HMGB1-Konzentrationen unter verschiedenen systemischen Therapien mit IL-12/IL-23-Inhibitor (n=6), mit TNFα Inhibitor (n=16), mit Fumarsäureester (n=16) und mit Methotrexat (n=6), bestimmt via ELISA. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001, Mann-Whitney U Test

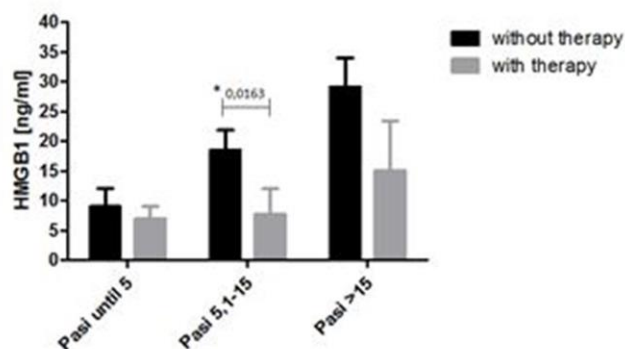
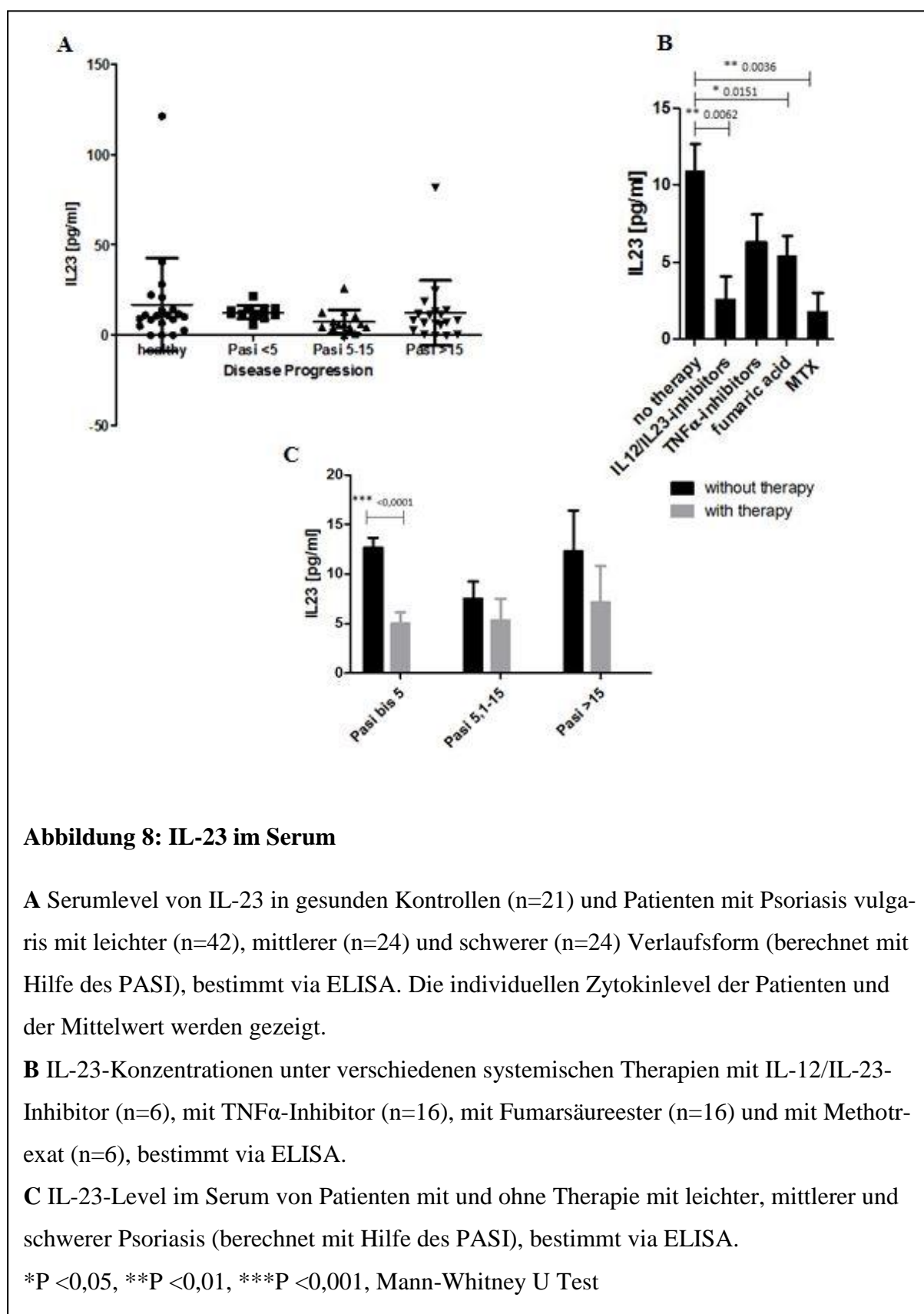


Abbildung 7: HMGB1 im Serum mit und ohne Therapie

HMGB1-Level im Serum von Patienten mit und ohne Therapie mit leichter, mittlerer und schwerer Psoriasis (berechnet mit Hilfe des PASI), bestimmt via ELISA. *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001, Mann-Whitney U Test

Unter Standardtherapien für Psoriasis vulgaris, wie Fumarsäureester, TNFα-Inhibitoren oder Methotrexat, sinkt die Konzentration von HMGB1 im Serum der Patienten. Somit fällt die HMGB1-Konzentration von 20-25 ng/ml Serum auf unter 10ng/ml Serum bei Therapien mit Fumarsäureestern, TNFα-Inhibitoren und Methotrexat im Vergleich zu unbehandelten Patienten (siehe Abbildung 6). Ustekinumab, ein IL-12/23-Inhibitor, zeigt keinen Effekt auf die Konzentration von HMGB1.

Betrachtet man die verschiedenen Schweregrade der Psoriasis (leicht, mittel und schwer), sieht man in allen Patientenseren einen Abfall der HMGB1-Konzentration unter Therapie. So sieht man in der Gruppe der Patienten mit mittelstark ausgeprägter Psoriasis vulgaris (PASI 5,1-15) einen signifikanten Abfall um ca. 10 ng HMGB1/ml Serum (siehe Abbildung 7).



Im Serum der Patienten mit Psoriasis vulgaris und in der Kontrollgruppe konnte ein kaum messbarer Spiegel an IL-23 bestimmt werden. Die ELISA-Messungen ergaben bei den Kontrollen, so wie bei den Patienten mit leichter, mittelstarker und starker Psoriasis vulgaris, IL-23-Konzentrationen von 10-20 pg/ml Serum (siehe Abbildung 8A) und es zeigte sich keine Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung.

Jedoch konnte ein Abfall der IL-23-Konzentration unter den vier getesteten Standardtherapien beobachtet werden. Ein signifikanter Abfall wurde bei Patienten bei Behandlung mit Methotrexat, Ustekinumab und Fumarsäureestern erreicht. Unter Therapie mit TNF α -Inhibitoren fiel die Konzentration von IL-23 nur gering ab. Patienten mit Methotrexat- oder Ustekinumab-Therapie zeigten die geringsten IL-23-Serumspiegel von 4 pg/ml (siehe Abbildung 8B).

Im Vergleich der verschiedenen Schweregrade mit und ohne Therapie zeigten nur Patienten mit leichter Psoriasis vulgaris (PASI <5) einen signifikanten Abfall der IL-23-Konzentration im Serum unter Therapie. So konnte durch eine Therapie der Spiegel von 13 pg IL-23/ml Serum auf 6 pg IL-23/ml Serum gesenkt werden (siehe Abbildung 8C).

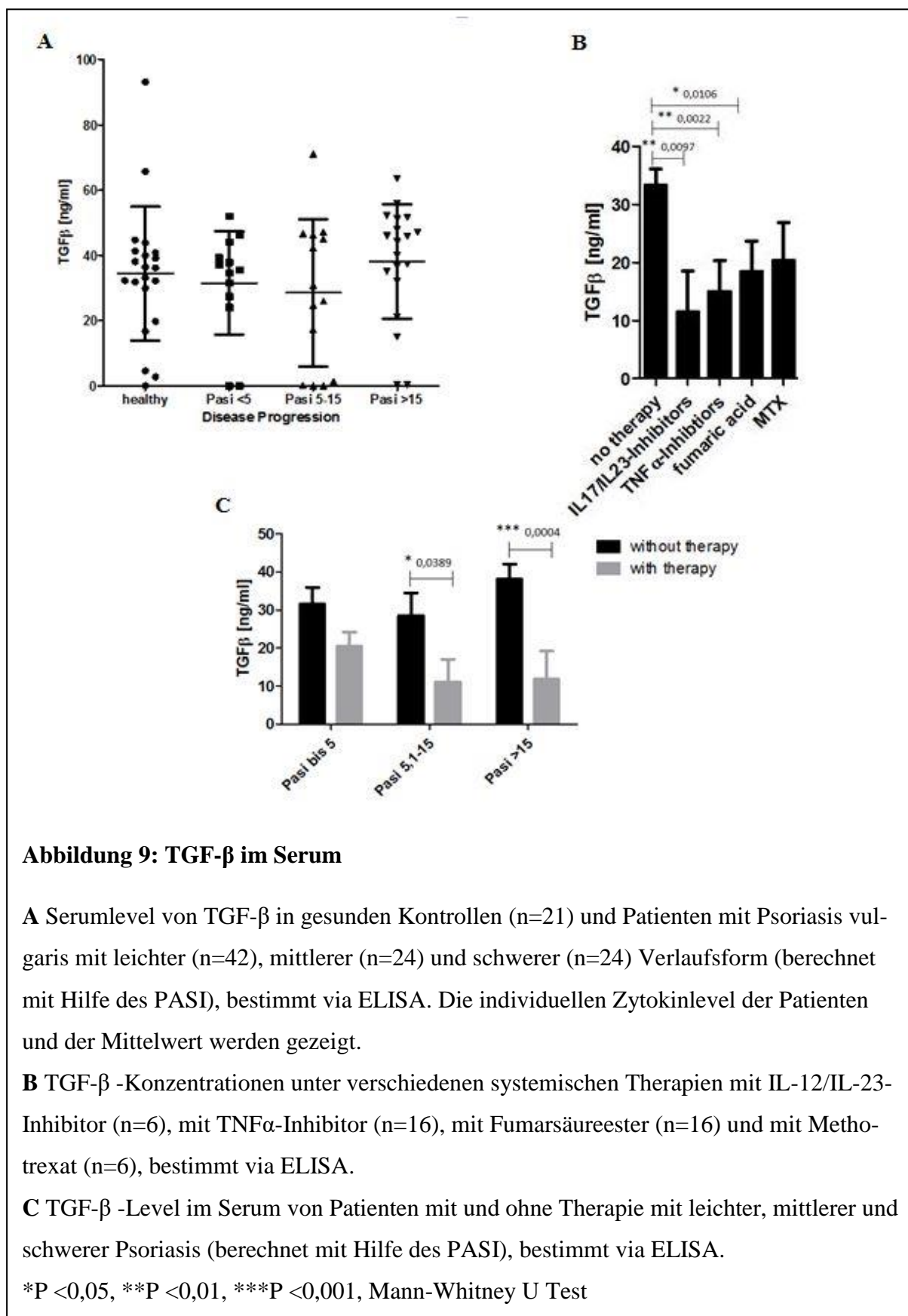


Abbildung 9: TGF-β im Serum

A Serumlevel von TGF-β in gesunden Kontrollen (n=21) und Patienten mit Psoriasis vulgaris mit leichter (n=42), mittlerer (n=24) und schwerer (n=24) Verlaufsform (berechnet mit Hilfe des PASI), bestimmt via ELISA. Die individuellen Zytokinlevel der Patienten und der Mittelwert werden gezeigt.

B TGF-β -Konzentrationen unter verschiedenen systemischen Therapien mit IL-12/IL-23-Inhibitor (n=6), mit TNFα-Inhibitor (n=16), mit Fumarsäureester (n=16) und mit Methotrexat (n=6), bestimmt via ELISA.

C TGF-β -Level im Serum von Patienten mit und ohne Therapie mit leichter, mittlerer und schwerer Psoriasis (berechnet mit Hilfe des PASI), bestimmt via ELISA.

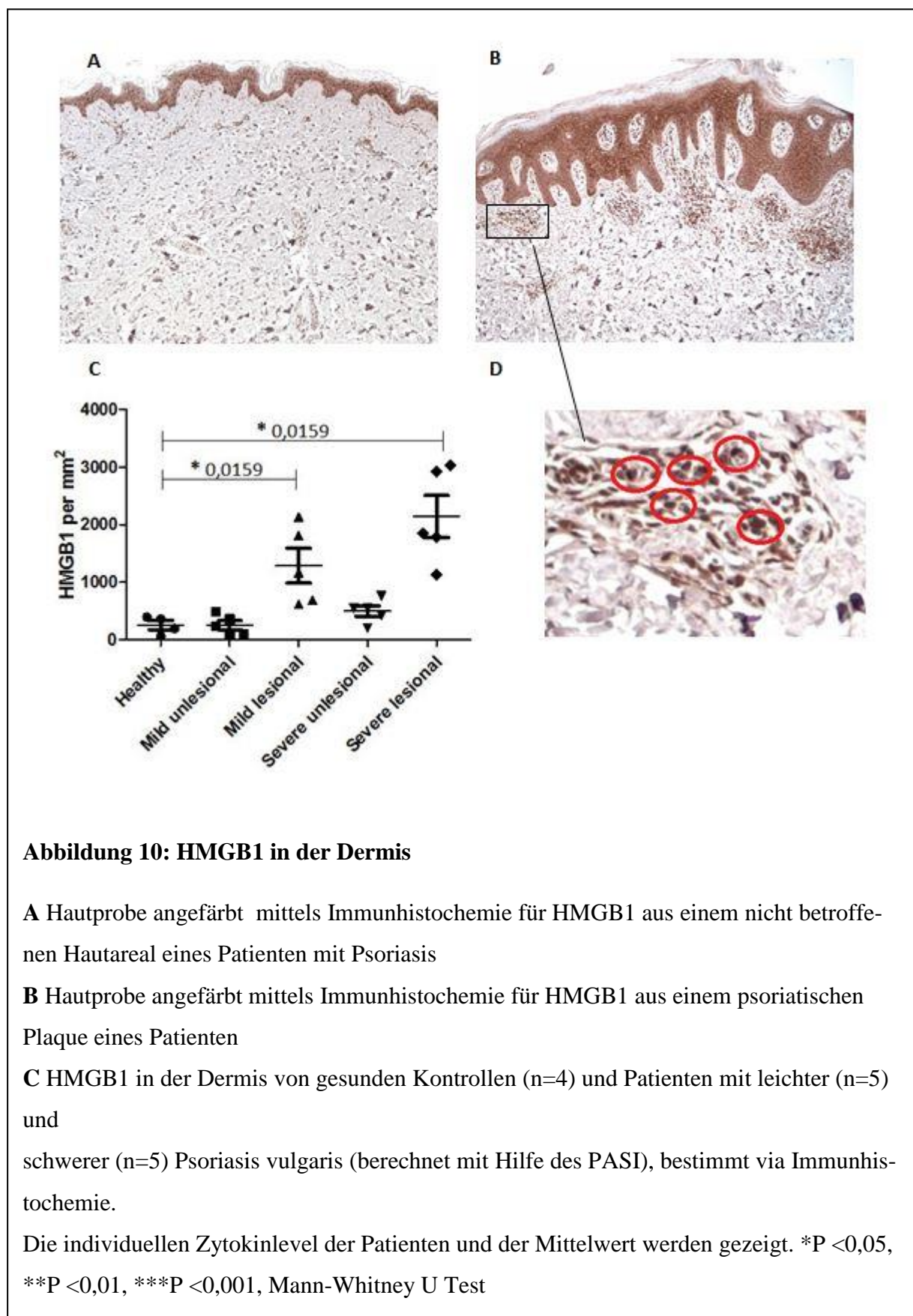
*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, Mann-Whitney U Test

Die Serumkonzentration von TGF- β ist nicht erhöht bei Patienten mit Psoriasis vulgaris und zeigt auch keine Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung. Im Durchschnitt beträgt die Konzentration 20-30 ng TGF- β /ml Serum bei allen drei Schweregraden der Patienten mit Psoriasis vulgaris und in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 9A).

Unsere Analyse zeigt bei Patienten unter Therapie mit Methotrexat, TNF α -Inhibitoren, Fumarsäureestern und Ustekinumab einen Abfall der TGF- β -Konzentration. Den stärksten Einfluss hat die Therapie mit Ustekinumab bei einem Abfall von 15 ng TGF- β /ml Serum im Vergleich zu Patienten ohne Therapie (siehe Abbildung 9B).

Sowohl bei leichtem, mittelstarkem und starkem Schweregrad der Psoriasis vulgaris bewirkt eine Therapie einen Abfall des TGF- β -Serumspiegels, auch wenn er in der Gruppe der mittelstarken Patienten nicht signifikant ist (siehe Abbildung 9C)

4.1.2 HMGB1, IL-17 und CD3 in der Haut



Die Abbildung 10A und B zeigen die beiden Hautproben eines gesunden Hautareals (A) und eines psoriatischen Plaques (B) eines Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris.

Eine allgemeine Betrachtung zeigt zunächst die klassischen histologischen Merkmale der Psoriasis vulgaris. Die klinische Plaquebildung erklärt sich durch eine Zunahme der Epidermisdicke (Akanthose) mit verstärkter Schuppenbildung, welche durch eine zu schnelle Reifung der Keratinozyten mit anschließender Retention der Zellkerne bis in das Stratum corneum (Parakeratose) bedingt ist. Außerdem wird eine Elongation der papillären Reteleiste (Papillomatose) mit vermehrter zellulärer Infiltration in der Dermis deutlich. In der immunhistochemischen Färbung mit Cobalt werden die HMGB1-Moleküle dunkelbraun angefärbt (siehe Abbildung 10D). Die Ansammlung der HMGB1-Moleküle zeigt sich unterhalb des Stratum papillare in unscharf abgrenzbaren Verbänden.

In den betroffenen Hautarealen von Patienten mit Psoriasis vulgaris zeigt sich eine erhöhte Konzentration von HMGB1 im Vergleich zu der unbetroffenen Haut. Die Patienten mit leichter Psoriasis vulgaris weisen in den Plaques eine Konzentration von ca. 1200 HMGB1-Molekülen pro mm^2 Haut und die schweren Psoriasispatienten eine Konzentration von ca. 2100 HMGB1-Molekülen pro mm^2 Haut auf. Die Konzentration von HMGB1 in der unbetroffenen Dermis der Patienten mit milder Psoriasis vulgaris (256 HMGB1-Moleküle/ mm^2) ist vergleichbar mit der von gesunden Kontrollen (256 HMGB1-Moleküle/ mm^2). Die Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris zeigen jedoch die doppelte Konzentration an HMGB1-Molekülen pro mm^2 Dermis (499 HMGB1-Moleküle/ mm^2) (siehe Abbildung 10C). Somit kann eine Korrelation der HMGB1-Konzentration in der Dermis mit Zunahme des Schweregrades der Psoriasis vulgaris in den betroffenen Hautarealen angenommen werden. Ein Anstieg der HMGB1-Moleküle in der unbetroffenen Haut kann nur in der Gruppe der Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris gemessen werden.

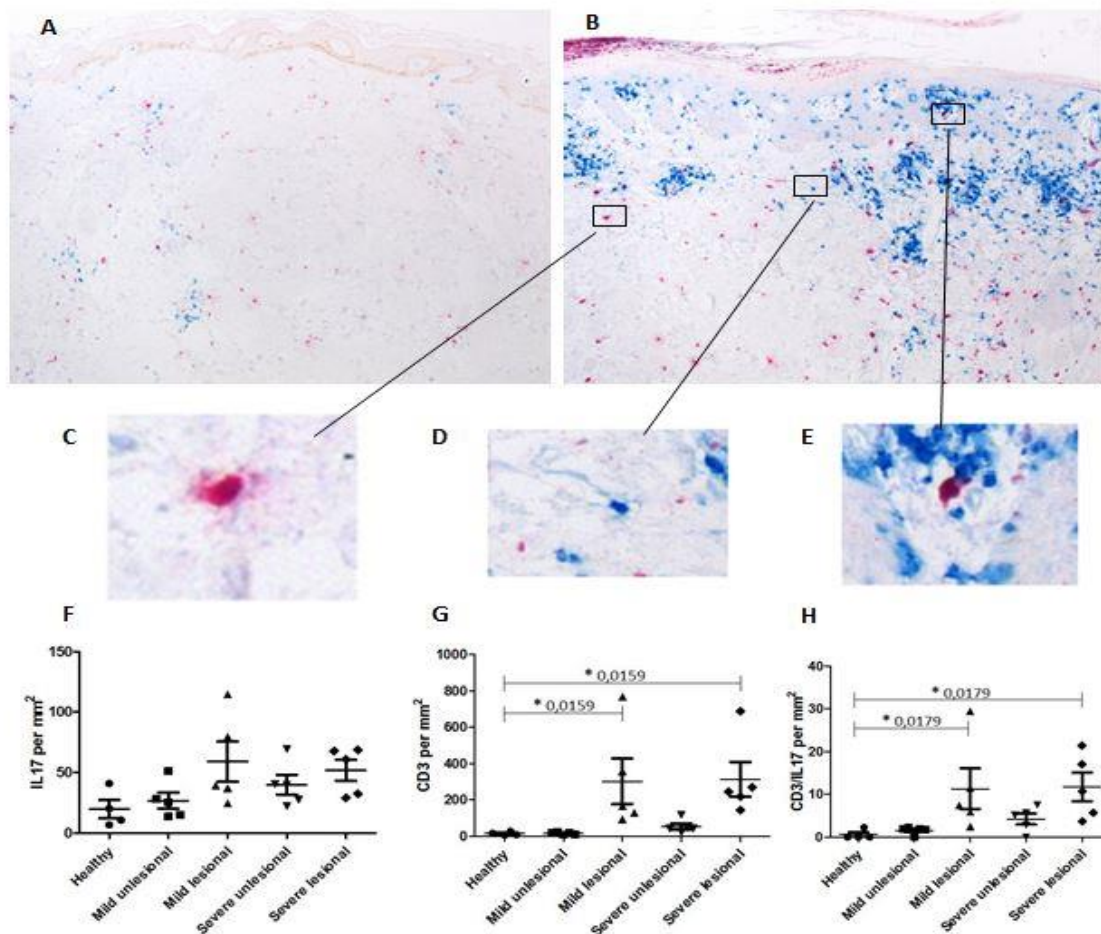


Abbildung 11: IL-17 und CD3 in der Dermis

A Hautprobe angefärbt mittels Immunhistochemie für IL-17 (rot) und CD3 (blau) aus einem nicht betroffenen Hautareal eines Psoriatikers

B Hautprobe angefärbt mittels Immunhistochemie für IL-17 (rot) und CD3 (blau) aus einem psoriatischen Plaque eines Patienten

C Detaillierte Ansicht der IL-17 Expression in der Dermis

D Detaillierte Ansicht der CD3 Expression in der Dermis

E Detaillierte Ansicht der IL-17+CD3+ Zellen in der Dermis

F+G+H IL-17, CD3 und IL-17+CD3 in der Haut von gesunden Kontrollen (n=4) und Patienten mit leichter (n=5) und schwerer (n=5) Psoriasis vulgaris (berechnet mit Hilfe des PASI), bestimmt via Immunhistochemie.

Die individuellen Zytokinlevel der Patienten und der Mittelwert werden gezeigt. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, Mann-Whitney U Test

Die Bestimmung des T Zell-Markers CD3 und des Interleukins 17 (IL-17) erfolgte in der Haut, mit Hilfe des Verfahrens der Immunhistochemie. Um IL-17 produzierende T Zellen identifizieren zu können, wurde eine Doppelfärbung angewendet. Die IL-17 Moleküle wurden rot und der CD3-Rezeptor blau angefärbt. Auf eine HE-Färbung des Gewebes wurde zur besseren Darstellung der roten und blauen Farben verzichtet.

Die Abbildung 11A und B zeigen die immunhistochemische Anfärbung der beiden Marker in einer unbetreffenen Hautstelle und in einer betroffenen Hautregion eines Patienten mit Psoriasis vulgaris. Sowohl in der Dermis, als auch in der Epidermis, des betroffenen Hautareals sind die Moleküle IL-17 (siehe Abbildung 11C) und CD3 (siehe Abbildung 11D) vermehrt sichtbar im Vergleich zu der nicht betroffenen Haut des Patienten. Zudem sind Doppelfärbungen erkennbar, welche sowohl rote, als auch blaue Anteile haben. Diese violett erscheinenden Punkte stellen die IL-17 produzierenden T Zellen dar (siehe Abbildung 11E).

Die Abbildung 11F zeigt, dass der Anteil des IL-17 pro mm^2 betroffener Haut bei den Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zur eigenen unbetreffenen Haut und zu der Haut der gesunden Kontrollgruppe ansteigt. Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris zeigen eine durchschnittliche IL-17-Konzentration von $52/\text{mm}^2$ Dermis, die Patienten mit milder Psoriasis vulgaris von $59/\text{mm}^2$ und die gesunde Kontrollgruppe von $20/\text{mm}^2$. Dies verdeutlicht einen nicht Schweregrad-abhängigen Anstieg bei Patienten mit Psoriasis vulgaris, jedoch ohne Signifikanz.

Außerdem ist eine Tendenz erkennbar, dass Patienten mit Psoriasis vulgaris bereits in der unbetreffenen Haut mehr IL-17 pro mm^2 Dermis aufweisen als gesunde Patienten. So zeigt sich in der unbetreffenen Haut von Patienten mit schweren und milden Krankheitsverläufen eine Konzentration von 40 IL-17 Molekülen/ mm^2 Dermis und 25 IL-17 Molekülen/ mm^2 Dermis im Vergleich zu den gesunden Kontrollen mit einer Konzentration von 20 IL-17 Molekülen/ mm^2 Dermis.

Die Konzentration des T Zell-Rezeptors CD3 ist in psoriatischen Plaques signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (15 CD3-Rezeptoren pro mm^2 Dermis). Sowohl Patienten mit leichter, als auch mit schwerer Psoriasis, weisen in der läsionalen Haut eine durchschnittliche Konzentration von 303 und 314 CD3-Rezeptoren pro mm^2 Dermis (siehe

Abbildung 11G). Dies entspricht einem signifikanten, 20-fachen Anstieg der CD3-Rezeptoren in der betroffenen Dermis, ohne Berücksichtigung des Schweregrads.

Die unbetroffene Dermis der Patienten mit milder Psoriasis vulgaris weist eine ähnliche CD3-Rezeptor-Konzentration auf, wie die der gesunden Kontrollgruppe (15,8 und 15,3 CD3-Rezeptoren/ mm² Dermis). Wohingegen die unbetroffene Dermis der Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris eine durchschnittliche Konzentration von 55 CD3-Rezeptoren/ mm² aufweist.

Die Anzahl der IL-17 produzierenden T Zellen in der betroffenen Dermis von Patienten mit leichter und schwerer Psoriasis vulgaris ist signifikant erhöht im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe. So zeigen Patienten mit milder und schwerer Psoriasis vulgaris eine Konzentration von 11 und 12 IL-17+ CD3+ Zellen pro mm² Dermis im Vergleich zu den gesunden Kontrollen mit Werten von durchschnittlich 0,5 IL-17+ CD3+ Zellen pro mm² Dermis (siehe Abbildung 11H).

In der unbetroffenen Dermis von Patienten mit Psoriasis vulgaris sind nur sehr geringe Konzentrationen von IL-17+ CD3+ Zellen pro mm² messbar.

4.2 Phänotypisierung der Immunzellen aus dem Blut

Im zweiten Teil der Arbeit erfolgte die Phänotypisierung der verschiedenen Immunzellpopulationen im Blut, mit Hilfe des Verfahrens der Durchflusszytometrie. Dafür wurde 10 gesunden Kontrollen, 11 Patienten mit leichter und 11 Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris Blut entnommen und die peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut isoliert (siehe Kapitel 3.1).

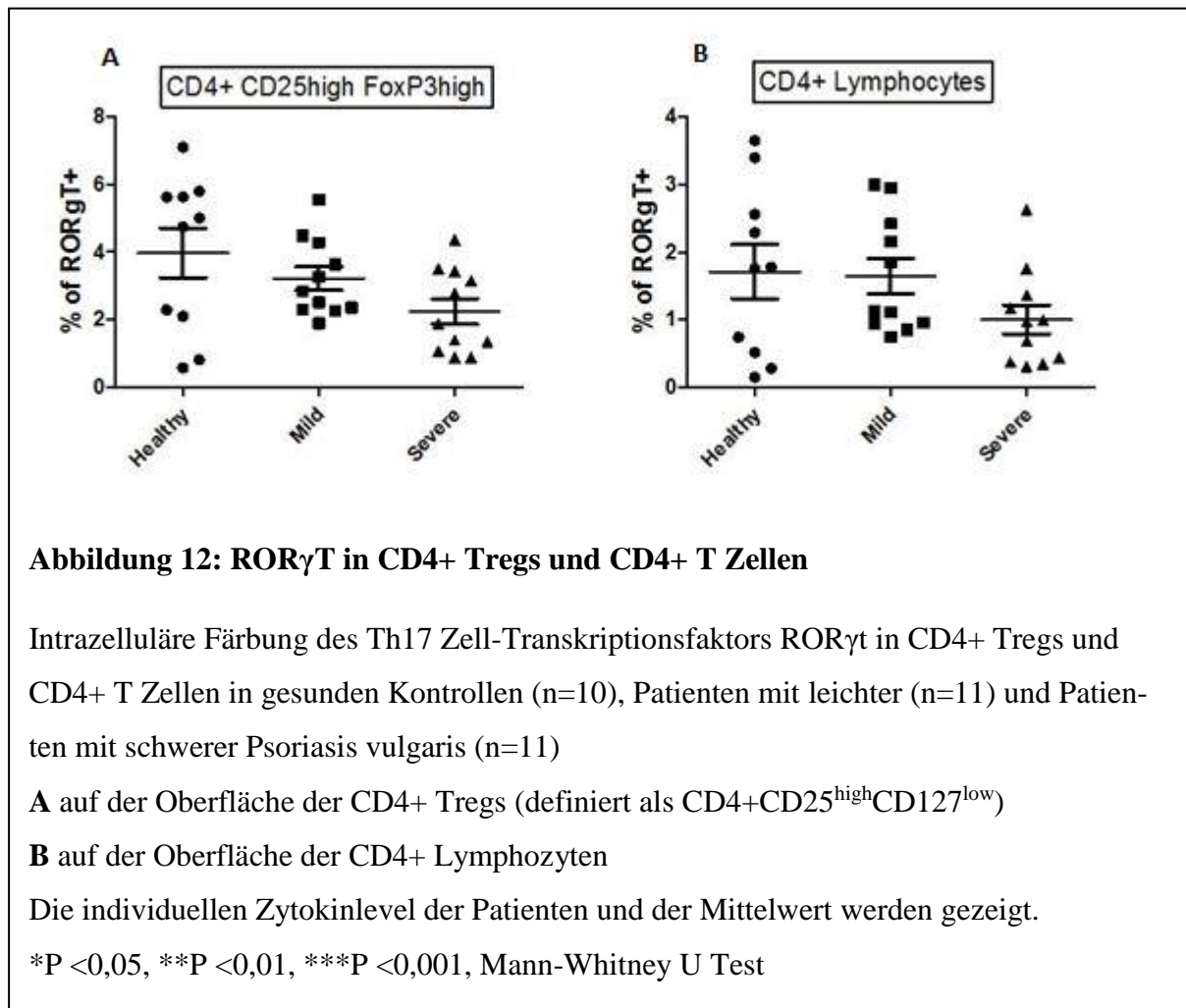
Ein besonderer Fokus liegt bei dieser Typisierung auf den Th17 Zellen und den regulatorischen T Zellen.

Als spezifischer Marker für Th17 Zellen wurde die intrazelluläre Expression von ROR γ T und die gleichzeitige Expression der beiden Oberflächenmarker CCR6 und dem IL-23-Rezeptor verwendet.

Tregs wurden über die vermehrte Oberflächenexpression von CD25 (CD25^{high}) und die intrazelluläre Expression von FoxP3 und die verminderte Oberflächenexpression von CD127 (CD127^{low}) durchflusszytometrisch bestimmt.

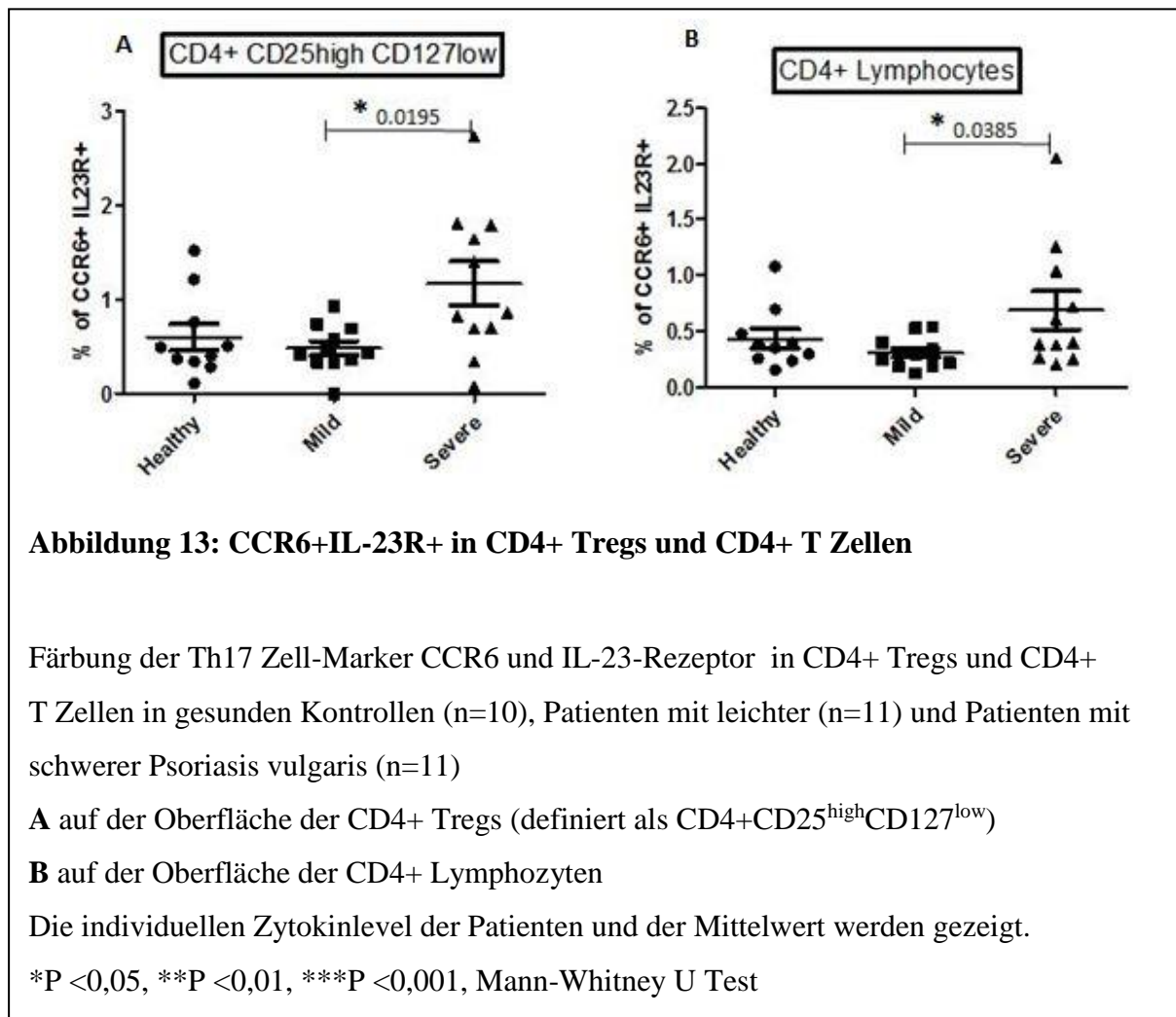
Zudem wurden auch die Rezeptoren für HMGB1 Toll like Rezeptor 2 (TLR2) und 4 (TLR4) und der Rezeptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) auf der Zelloberfläche von CD4⁺, CD8⁺ und regulatorischen T-Zellen quantifiziert.

4.2.1 Der Transkriptionsfaktor ROR γ T und der CCR6- und IL-23 Rezeptor als Marker für Th17 Zellen



Der Transkriptionsfaktor ROR γ T, welcher spezifisch für Th17 Zellen ist, ist intrazellulär in CD4+ T Helferzellen und in CD4+ Tregs von Patienten mit Psoriasis vulgaris verringert. In gesunden Probanden exprimieren im Durchschnitt 4% der Tregs den Transkriptionsfaktor im Vergleich zu schweren Psoriatikern, in deren Blut nur 2,2% der regulatorischen T Zellen ROR γ T intrazellulär nachweisen (siehe Abbildung 12A). In der Population der CD4+ Lymphozyten exprimieren 1,0% den Transkriptionsfaktor ROR γ T in Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris im Vergleich zu 1,7% ROR γ T+ CD4+ Lymphozyten in den gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 12B).

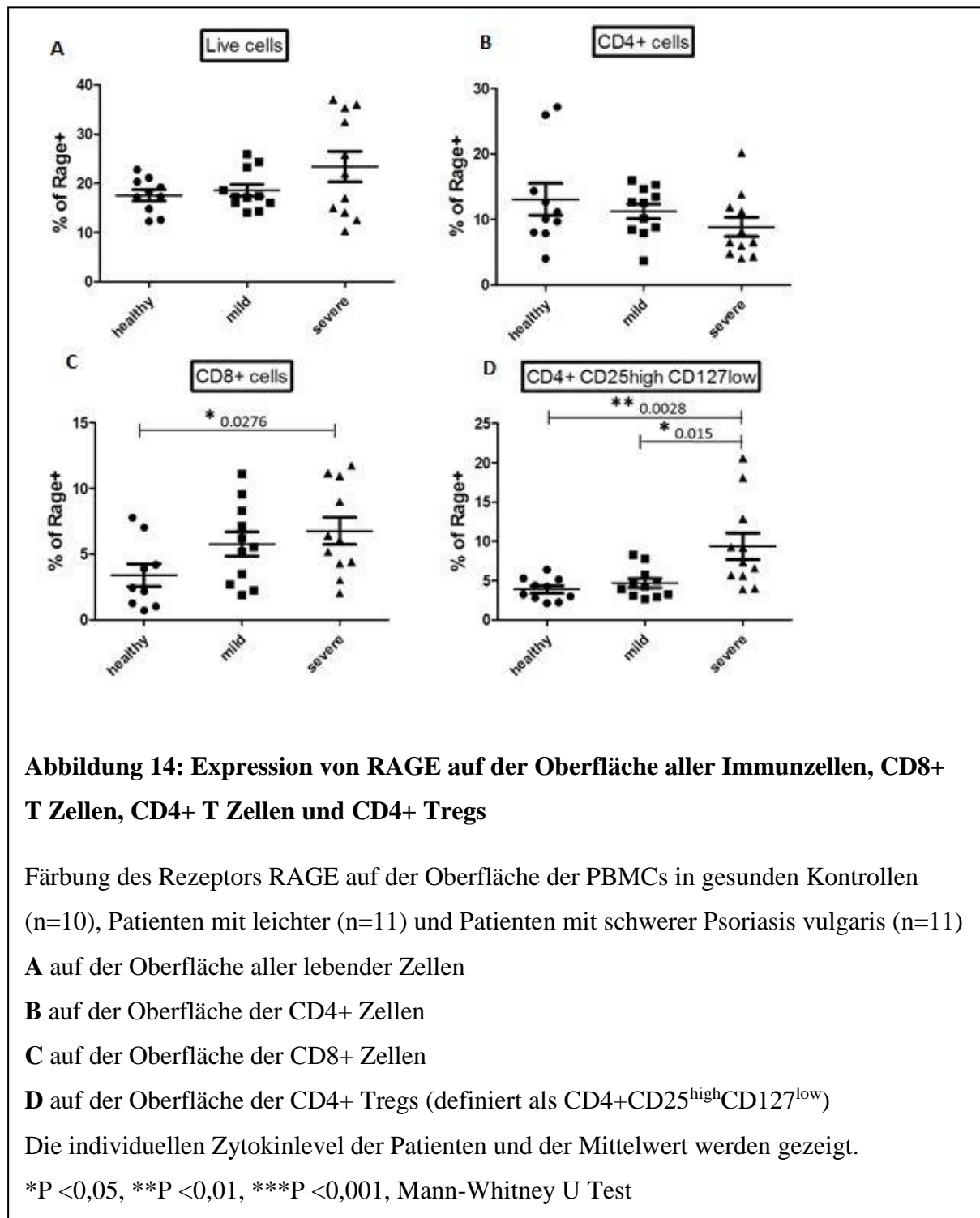
Es kann eine mögliche Korrelation zwischen dem steigenden Schweregrad der Psoriasis vulgaris und dem Abfall des Transkriptionsfaktors ROR γ T in den CD4+ Tregs angenommen werden, jedoch zeigt sich auf Grund der geringen Fallzahl keine Signifikanz.



Die Expression der beiden Oberflächenrezeptoren CCR6 und IL-23 Rezeptor (IL-23R) charakterisieren die Zelloberfläche von Th17 Zellen. Wir bestimmten diese beiden Marker auf den gewonnenen PBMCs und sahen eine signifikant vermehrte Expression auf der Oberfläche von CD4+ Tregs und CD4+ T Zellen der Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. 1,2% der CD4+ Tregs tragen die Rezeptoren auf ihrer Oberfläche in Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris im Vergleich zu 0,6% CCR6+ IL-23R+ in der Population der CD4+ Tregs in den gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 13A). In gesunden Probanden exprimieren im Durchschnitt 0,4% der CD4+ T Zellen die beiden Rezeptoren auf der Oberfläche im Vergleich zu schweren Psoriatikern, in deren Blut 0,7% der regulatorischen T Zellen CCR6 und IL-23-R nachweisen (siehe Abbildung 13B). Patienten mit leichter Psoriasis vulgaris zeigten keine erhöhte, wenn nicht sogar verminderte Expression

der beiden Marker mit 0,5% CCR6+ IL-23R+ in der Population der CD4+ Tregs und 0,35% CCR6+ IL-23R+ in der Population der CD4+ Lymphozyten (siehe Abbildung 13A+B). Somit zeigte sich keine Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung.

4.2.2 Die Expression der Rezeptoren RAGE, TLR2 und TLR4



Die Expression des Rezeptors RAGE auf der Oberfläche der gesamten Immunzellen zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich von Psoriatikern zu gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 14A).

Auch bei den CD4⁺ Zellen ist kein signifikanter Unterschied in der Expression von RAGE erkennbar, jedoch kann am ehesten von einer Abnahme der Rezeptordichte bei schweren Psoriatikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen oder Patienten mit leichter Psoriasis vulgaris ausgegangen werden. So tragen 8,9% der CD4⁺ Zellen RAGE auf ihrer Oberfläche in Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris im Vergleich zu 13,1% RAGE⁺ CD4⁺ Zellen in gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 14B).

Die weitere Spezifizierung in die Untergruppe der regulatorischen T Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen, definiert über die erhöhte Expression von CD25 und die verminderte Expression von CD127, zeigt eine vermehrte Expression von RAGE auf den CD4⁺ Tregs von schweren Psoriatikern im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und den Patienten mit leichter Psoriasis vulgaris. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe mit einem Median von 4% RAGE-positiven CD4⁺ Tregs im Vergleich zu einem Median von 10% der CD4⁺ Tregs mit dem Rezeptor RAGE auf der Zelloberfläche bei Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris (siehe Abbildung 14D).

Die CD8⁺ Zellen der schweren Psoriatiker exprimieren ebenfalls vermehrt den Rezeptor RAGE auf ihrer Zelloberfläche im Vergleich zu gesunden Kontrollen. So ergibt sich bei gesunden Kontrollen bei 4% der CD8⁺ Zellen eine Expression von RAGE im Vergleich zu 7% bei Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris (siehe Abbildung 14C).

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HMGB1 im Serum und in der Haut von Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ist.

Der Anstieg von HMGB1 im Serum der Patienten korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung und fällt unter Therapie mit TNF α -Inhibitoren, Methotrexat und Fumarsäureestern ab. Außerdem konnten wir zeigen, dass IL-23 und TGF β im Serum zwar keine Korrelation mit dem Schweregrad der Psoriasis vulgaris zeigen, jedoch unter den Standardtherapien im Serum abfallen.

In der psoriatischen Haut zeigte sich außerdem ein signifikanter Anstieg der CD3+ Zellen und der IL-17 produzierenden CD3+ Zellen. Auch die Konzentration an freiem IL-17 in den psoriatischen Plaques ist erhöht im Vergleich zu der unbetroffenen Haut der Patienten mit Psoriasis vulgaris.

Neben den Veränderungen in der Haut und im Serum der Patienten mit Psoriasis vulgaris, konnten in dieser Arbeit auch Unterschiede in den Immunzellpopulationen des peripheren Blutes erfasst werden. Die CD4+ Tregs und CD8+ Zellen im peripheren Blut der Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris exprimieren signifikant vermehrt den Rezeptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Außerdem detektierten wir eine vermehrte Co-Expression der Rezeptoren CCR6 und IL-23R auf der Oberfläche von CD4+ Zellen und CD4+ Tregs von Patienten mit Psoriasis vulgaris.

Die High Mobility Group Box 1 (HMGB1) wurde zunächst intrazellulär als Transkriptionsfaktor und zur Stabilisierung von Nukleosomen-Komplexen an der DNA detektiert (Walker et al., 1980). Jedoch hat dieses Molekül auch eine extrazelluläre Funktion. Wenn Gefahr oder Entzündung vorherrschen, wird es von Makrophagen sezerniert oder von nekrotischen Zellen freigesetzt. Außerhalb der Zelle wirkt HMGB1 in verschiedenen Autoimmunerkrankungen und auch in Krebserkrankungen wie ein proinflammatorisches Zytokin (Bonaldi et al., 2003). Deshalb wird es auch der Gruppe der entzündungsassoziierten Gefahrensignale oder auch Damage associated molecular patterns (DAMPs) zugeordnet (Scaffidi et al., 2002), (Lotze et al., 2007).

In den letzten Jahrzehnten betonten immer mehr Arbeitsgruppen die Rolle von HMGB1 in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen. Zum Beispiel wurden erhöhte Konzentration von HMGB1 in Hautläsionen von Patienten mit Lupus erythematoses, im Serum von Patienten

mit systemischer Sklerose und in den kleinen Speicheldrüsen von Patienten mit Sjögren's Syndrom bestimmt (Popovic et al., 2005), (Yoshizaki et al., 2009), (Ek et al., 2006). Bislang ist die Rolle von HMGB1 in diesen Autoimmunerkrankungen unklar, jedoch herrscht seit den letzten 5 Jahren die Hypothese, dass HMGB1 eine Differenzierung von regulatorischen T Zellen in IL-17 produzierende Zellen stimulieren könnte. Dieser Shift wurde bereits in der Graft-versus-Host Erkrankung, in der Hepatitis B, in der rheumatischen Arthritis, in der auto-immunen Myokarditis und in der Arteriosklerose nachgewiesen (Xu et al., 2015), (Li et al., 2014), (Y. Shi et al., 2012), (Z. Su et al., 2011), (Ding et al., 2016). Diese Differenzierung bedeutet eine starke immunologische Dysbalance in Richtung Entzündung. Regulatorische T Zellen, welche die Funktion und Interaktion anderer Lymphozyten hemmen und somit die Entzündung und Zerstörung des Gewebes limitieren, differenzieren in Th17 Zellen, welche das hoch inflammatorische Zytokin IL-17 produzieren und auch durch nachgeschaltete Zytokinausschüttung den entzündlichen Prozess somit stark fördern. Dies könnte ein entscheidender Schritt von antientzündlichen zu proentzündlichen Eigenschaften in der Initiierung und auch Aufrechterhaltung von Autoimmunerkrankungen sein.

Eine solche Differenzierung von Tregs zu IL-17 produzierenden Zellen konnte die Arbeitsgruppe von Bovenschen et al. bereits in der Psoriasis vulgaris nachweisen (Bovenschen et al., 2011). In dieser Arbeit wurde der Zell-Shift durch das Interleukin-23 verursacht und war verbunden mit einem intrazellulären Verlust an FoxP3, dem charakterisierenden Transkriptionsfaktor von Tregs, und einer Zunahme von ROR γ t, dem klassischen Marker für Th17 Zellen. In unserer Arbeit konnten wir im Serum der Patienten mit Psoriasis vulgaris keinen Anstieg von IL-23 messen. Dieses Zytokin könnte jedoch seine Funktion lokal in der Haut oder auch in den Lymphknoten der Patienten ausüben, so dass ein synergistischer Effekt von HMGB1 und IL-23 von Bedeutung sein kann. In unserem Therapievergleich der vier Standardtherapien für Psoriasis vulgaris sahen wir, dass die Therapie mit IL-12/IL-23-Inhibitoren eine Ausnahme darstellte: HMGB1 stieg im Serum der Patienten an. Dieses bislang unbeschriebene Phänomen unterstreicht einen potenziellen Synergismus dieser beiden Botenstoffe: Durch die Blockade von IL-23 durch die zielgerichtete Therapie mit IL-12/IL-23-Inhibitoren, wird im Gegenzug der Mitspieler HMGB1 im Serum erhöht.

Außerdem konnten wir im Therapievergleich zeigen, dass Methotrexat die Konzentration von HMGB1 im Serum am effektivsten senkt. Und auch Patienten mit TNF α -Inhibitoren und Fumarsäureester als Therapie zeigen ein Absinken von HMGB1 im Serum. Sundberg et al. untersuchten in der rheumatoiden Arthritis den Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die HMGB1-Konzentration. Sie konnten keinen Einfluss der Medikation auf den Serumspiegel von HMGB1 zeigen (Sundberg et al., 2008). Auch wenn die Diskrepanz dieser Ergebnisse unklar ist, könnten mögliche Differenzen in der unterschiedlichen Pathogenese der Psoriasis vulgaris und der rheumatoiden Arthritis mit lokal differentem Zytokinprofil liegen. Auch experimentelle Konditionen, wie der Zeitpunkt der Blutabnahme nach Therapiestart, könnten einen Einfluss nehmen.

Wie auch Bovenschen et al., zeigten bereits Li et al. und Ding et al. eine verstärkte Expression von ROR γ t und eine Abnahme von FoxP3 in peripheren mononukleären Zellen von Patienten mit Hepatitis B und Arteriosklerose nach in vitro Stimulation mit HMGB1 (Li et al., 2014), (Ding et al., 2016).

Unsere Daten zeigen einen Abfall des intrazellulären ROR γ t in CD4⁺ Zellen und CD4⁺ Tregs des peripheren Bluts der Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Wir vermuten, dass die IL-17 produzierenden Zellen, welche höhere Konzentrationen an ROR γ t exprimieren, in vivo in die Haut, als Hauptort der Entzündung, rekrutiert werden. Bereits Lewis et al. konnte zeigen, dass die Th17 Zellen in der läsionalen psoriatischen Haut 49-93% der CD4⁺ Zellen ausmachen im Vergleich zu nur 3-18% CD4⁺ Zellen aus dem peripheren Blut (Lewis et al., 2013). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die IL-17A Produktion der Zellen aus der Haut um ein vielfaches stärker war nach einer Stimulation mit PMA, Ionomycin und Brefeldine A, im Vergleich zu den Immunzellen aus der Peripherie. Die immunhistochemische Färbung von IL-17 und CD3 in unserer Arbeit, unterstreicht die hohe Anzahl an IL-17⁺ CD3⁺ Zellen in der betroffenen Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu der unbetroffenen Haut oder auch der gesunden Haut von den Kontrollen. Außerdem konnten wir im peripheren Blut der Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris einen deutlichen, signifikanten Anstieg der Rezeptoren CCR6 und IL-23R auf der Zelloberfläche der CD4⁺ Zellen und CD4⁺ Tregs nachweisen. Die gleichzeitige Expression dieser beiden Rezeptoren ist ein sehr gezielter Marker für Th17 Zellen (Acosta-Rodriguez et al., 2007).

Des Weiteren korrelieren unsere Daten mit der Arbeitsgruppe von Chen et al., welche zeigen konnten, dass HMGB1 im Serum von Patienten mit Psoriasis vulgaris erhöht ist im Vergleich zu Patienten mit atopischer Dermatitis und gesunden Kontrollen (Chen et al., 2013). Sie wiesen ebenfalls eine Korrelation von HMGB1 und dem Schweregrad der Psoriasis vulgaris mittels des Spearman Rank Tests nach. Eine genaue Unterteilung in die verschiedenen Schweregrade der Psoriasis vulgaris zeigte diese Arbeitsgruppe nicht. In unserer Arbeit (siehe Abbildung 5) ist zu erkennen, dass in Patienten mit milder Psoriasis vulgaris eine geringere Serumkonzentration von HMGB1 (10 ng HMGB1/ml Serum) im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe (20 ng HMGB1/ml Serum) vorliegt. HMGB1 ist dafür bekannt in die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen einzugreifen. Abraham et al. konnte die Hemmung der Phagozytose über drei verschiedene Mechanismen erklären. Erstens, bindet HMGB1 an das Phosphatidylserin, welches von apoptotischen Zellen zur Phagozytose-Vermittlung an Makrophagen sezerniert wird, und hemmt damit die Erkennung von Apoptose-bedürftigen Zellen (G. Liu et al., 2008). Zweitens, verhindert HMGB1 die Phagozytose-Aktivität der Makrophagen durch Bindung an ihr Oberflächenmolekül $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Friggeri et al., 2010). Und drittens, konnte die Arbeitsgruppe eine direkte Hemmung der Phagozytose durch das saure C-terminale Ende von HMGB1 nachweisen (Banerjee et al., 2010). Bezogen auf die Patientengruppe mit milder Psoriasis vulgaris würde dies bedeuten, dass diese Gruppe noch in der Lage zu sein scheint die apoptotischen Zellen zu eliminieren. Der Effekt von HMGB1 ist in dieser Konzentration noch sehr gering auf die Umwelt und die Menge der apoptotischen Zellen kann eliminiert werden. Die Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris zeigen eine durchschnittliche Konzentration von 30 ng HMGB1/ml Serum, welches einen dreifachen Anstieg im Vergleich zu der Gruppe mit leichter Psoriasis vulgaris bedeutet. Eine Studie bezüglich der Konzentration von HMGB1 konnte zeigen, dass solch hohe Level an HMGB1 im Serum (30-300 ng HMGB1/ ml) eine signifikante Toxizität verursachen (Baker et al., 1976) und somit auch die Phagozytose beeinträchtigt.

Neben dem Einfluss von HMGB1 auf die Immunzellen von Patienten, stehen nun auch die Keratinozyten als Barrierefunktion der Haut als potentielle Zielstrukturen von HMGB1 im Fokus. Eine sehr aktuelle Arbeit unter Zhang et al. konnte in einem Imiquimod-induzierten psoriasiformen Mausmodell zeigen, dass Keratinozyten in den psoriatischen Läsionen eine vermehrte Expression von TLR2 und TLR4 im Vergleich zu gesunder Haut aufweisen (Zhang et al., 2017).

RAGE konnten sie nicht vermehrt nachweisen. Unter Stimulation der Keratinozyten mit HMGB1 zeigten diese eine vermehrte Sekretion von Interleukin-18. Nach einer Blockade von HMGB1 durch die Injektion von Anti-HMGB1 Antikörpern in das Peritoneum der Psoriasis-ähnlichen Maus, wurden weniger CD3⁺ T Zellen und CD4⁺ ROR γ t⁺ Th17 Zellen in den psoriatischen Plaques, sowie eine verminderte Konzentration von IL-17 im Serum der Mäuse gemessen. Zhang et al. vermuten, dass HMGB1 über die Induktion von IL-18 in den Keratinozyten eine Th17 Immunantwort in Psoriasis vulgaris vermittelt. Mit Blick auf unsere Ergebnisse im Menschen, wäre auch eine direkte Interaktion von HMGB1 mit RAGE auf der Oberfläche der Immunzellen in Patienten mit Psoriasis vulgaris möglich.

Die aktuelle Rolle von HMGB1 in Autoimmunerkrankungen und besonders in der Psoriasis vulgaris ist weiterhin nicht vollends verstanden. Bezogen auf die bislang existierenden Arbeiten und unsere aktuellen Daten vermuten wir, dass HMGB1, welches durch nekrotische Keratinozyten oder Immunzellen sezerniert wird, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris spielt. Insbesondere der Einfluss auf die Homöostase der immunsupprimierenden Tregs und hochentzündlichen Th17 Zellen könnte ein wichtiger Schritt in der fehlregulierten Immunantwort sein. Funktionelle Daten werden nötig sein, um den Einfluss der erhöhten Konzentration von HMGB1 in der Haut und im Serum auf die vermehrte Anzahl an RAGE auf der Zelloberfläche von psoriatischen Tregs und die möglicherweise darauffolgende Differenzierung von Tregs zu Th17 Zellen zu klären. Eine Untersuchung der HMGB1-Konzentrationen in der Haut und im Serum von Patienten unter Therapie mit den neu auf dem Markt erschienen Interleukin-17-Inhibitoren wäre von großem Interesse oder auch eine genaue Aufklärung des Einflusses von HMGB1 auf humane Keratinozyten scheint nach der Arbeit von Zhang et al. von besonderer Bedeutung. Weitere Studien mit größeren Patientenzahlen könnten einen möglichen Nutzen von HMGB1 als Biomarker oder sogar als potentielles Ziel einer neuen Therapie in der Psoriasis vulgaris herausarbeiten.

6 Zusammenfassung

Die Rolle des entzündungsassoziierten Gefahrensignals HMGB1 wurde bereits in verschiedenen Autoimmunerkrankungen und Krebserkrankungen diskutiert, nachdem ein erhöhtes Expressionslevel von HMGB1 in Blutseren und in Gewebe von Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erkannt wurde. In den letzten 5 Jahren, konnte eine mögliche Rolle von HMGB1 in der Entzündung deutlicher herausgearbeitet werden.

Bei genauerer Betrachtung der Autoimmunerkrankung Psoriasis vulgaris sind bislang nur sehr wenige Arbeiten zu HMGB1 erschienen. Psoriasis vulgaris ist eine der zehn häufigsten Autoimmunerkrankungen in der Bevölkerung und die Therapie nimmt einen immer spezifischeren Weg in der Pathogenese der Erkrankung.

Der erste Teil dieser Arbeit unterstreicht, dass HMGB1 auch ein potentielles Zielmolekül in der Therapie der Psoriasis vulgaris ist. Im Serum steigt die Konzentration in Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung an und auch in der Haut zeigen sich erhöhte Werte in den betroffenen Hautarealen der Patienten. Aktuell verwendete Standardtherapien, wie Methotrexat, Fumarsäureester und TNF α -Inhibitoren, senken die HMGB1-Last im Serum. Und auch die neusten funktionellen Daten von Zhang et al. zeigen, dass die Injektion von Anti-HMGB1 Antikörpern in einem psoriasiformen Mausmodell die Entzündung in der Haut und im Serum signifikant senkt (Zhang et al., 2017).

Der zweite Teil dieser Arbeit unterstützt die Annahme, dass HMGB1 Einfluss auf die regulatorischen T Zellen von Patienten mit Psoriasis vulgaris nehmen kann. Im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen zeigen die psoriatischen Tregs und die CD8⁺ Zellen im Immunsystem eine deutlich erhöhte Expression von RAGE auf ihrer Zelloberfläche. Ein Einfluss von HMGB1 auf Tregs ist bereits in anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben, in denen diese zu IL-17 produzierenden Zellen differenzieren (Z. Su et al., 2011), (Xu et al., 2015). Die vermehrte Anzahl an Th17 Zellen konnte mit Hilfe der erhöhten Co-Expression von den Rezeptoren CCR6 und IL-23-R in dem peripheren Blut in Patienten mit schwerer Psoriasis vulgaris nachgewiesen werden.

In der Zusammenschau der Daten sind weitere funktionelle Untersuchungen von Bedeutung, um den genauen Zusammenhang zwischen der erhöhten HMGB1-Konzentrationen, der vermehrten Expression seines Rezeptors RAGE und der daraus resultierende Differenzierung von Tregs zu IL-17 produzierenden Zellen zu klären, jedoch ebnet diese Arbeit den Weg zu einem ersten Verständnis von der möglichen Rolle von HMGB1 in der Psoriasis vulgaris.

Literaturverzeichnis

1. Abuabara, K., Lee, H., Kimball, A. B. (2011). The effect of systemic psoriasis therapies on the incidence of myocardial infarction: a cohort study. *Br J Dermatol* 165, 1066-1073.
2. Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-646.
3. Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.
4. Baker, C., Isenberg, I., Goodwin, G. H., Johns, E. W. (1976). Physical studies of the nonhistone chromosomal proteins HMG-U and HMG-2. *Biochemistry* 15, 1645-1649.
5. Banerjee, S., Friggeri, A., Liu, G., Abraham, E. (2010). The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *J Leukoc Biol* 88, 973-979.
6. Bettelli, E., Korn, T., Kuchroo, V. K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19, 652-657.
7. Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., Bianchi, M. E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 22, 5551-5560.
8. Bovenschen, H. J., van de Kerkhof, P. C., van Erp, P. E., Woestenenk, R., Joosten, I., Koenen, H. J. (2011). Foxp3+ regulatory T cells of psoriasis patients easily differentiate into IL-17A-producing cells and are found in lesional skin. *J Invest Dermatol* 131, 1853-1860.
9. Bustin, M., Hopkins, R. B., Isenberg, I. (1978). Immunological relatedness of high mobility group chromosomal proteins from calf thymus. *J Biol Chem* 253, 1694-1699.
10. Chen, T., Guo, Z. P., Li, L., Wang, L., Jia, R. Z., Cao, N., Qin, S., Li, M. M. (2013). Increased HMGB1 serum levels and altered HMGB1 expression in patients with psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 305, 263-267.
11. Di Meglio, P., Perera, Gayathri K., Nestle, Frank O. (2011). The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity* 35, 857-869.
12. Ding, J. W., Zheng, X. X., Zhou, T., Tong, X. H., Luo, C. Y., Wang, X. A. (2016). HMGB1 Modulates the Treg/Th17 Ratio in Atherosclerotic Patients. *J Atheroscler Thromb* 23, 737-745.
13. Ek, M., Popovic, K., Harris, H. E., Naucler, C. S., Wahren-Herlenius, M. (2006). Increased extracellular levels of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in minor salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 54, 2289-2294.
14. Friggeri, A., Yang, Y., Banerjee, S., Park, Y.-J., Liu, G., Abraham, E. (2010). HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the $\alpha\beta3$ -integrin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 299, C1267-C1276.

15. Gelfand, J. M., Troxel, A. B., Lewis, J. D., Kurd, S. K., Shin, D. B., Wang, X., Margolis, D. J., Strom, B. L. (2007). The risk of mortality in patients with psoriasis: results from a population-based study. *Arch Dermatol* 143, 1493-1499.
16. Gerdes, S., Mrowietz, U. (2012). [Comorbidities and psoriasis. Impact on clinical practice]. *Hautarzt* 63, 202-213.
17. Griffiths, C. E., Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 370, 263-271.
18. Health.com. (2017). Plaque Psoriasis – Types, Symptoms, Pictures, Causes, Treatment.
19. Heath, W. R., Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.
20. Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162, 5317-5326.
21. Javaherian, K., Liu, J. F., Wang, J. C. (1978). Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 change the DNA helical structure. *Science* 199, 1345-1346.
22. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30, 531-564.
23. Kleinewietfeld, M., Hafler, D. A. (2013). The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 25, 305-312.
24. Langer, P. D. m. H. E. (2015). Biologika. Retrieved 08.11., 2016
25. Lee, M. S., Lin, R. Y., Lai, M. S. (2014). Increased risk of diabetes mellitus in relation to the severity of psoriasis, concomitant medication, and comorbidity: a nationwide population-based cohort study. *J Am Acad Dermatol* 70, 691-698.
26. Lewis, B. J., Rajpara, S., Haggart, A. M., Wilson, H. M., Barker, R. N., Ormerod, A. D. (2013). Predominance of activated, clonally expanded T helper type 17 cells within the CD4+ T cell population in psoriatic lesions. *Clin Exp Immunol* 173, 38-46.
27. Li, J., Wang, F. P., She, W. M., Yang, C. Q., Li, L., Tu, C. T., Wang, J. Y., Jiang, W. (2014). Enhanced high-mobility group box 1 (HMGB1) modulates regulatory T cells (Treg)/T helper 17 (Th17) balance via toll-like receptor (TLR)-4-interleukin (IL)-6 pathway in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 21, 129-140.
28. Licona-Limon, P., Kim, L. K., Palm, N. W., Flavell, R. A. (2013). TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 14, 536-542.
29. Liu, G., Wang, J., Park, Y. J., Tsuruta, Y., Lorne, E. F., Zhao, X., Abraham, E. (2008). High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. *J Immunol* 181, 4240-4246.
30. Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S.

- F.,Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711.
31. Lotze, M. T., Deisseroth, A.,Rubartelli, A. (2007). Damage associated molecular pattern molecules. *Clin Immunol* 124, 1-4.
 32. Lotze, M. T., Frana, L. W., Sharrow, S. O., Robb, R. J.,Rosenberg, S. A. (1985). In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. *J Immunol* 134, 157-166.
 33. Lotze, M. T.,Tracey, K. J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5, 331-342.
 34. Lynde, C. W., Poulin, Y., Vender, R., Bourcier, M.,Khalil, S. (2014). Interleukin 17A: Toward a new understanding of psoriasis pathogenesis. *J Am Acad Dermatol* 71, 141-150.
 35. Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Rossi, M. C., Querci, V., Mazzoni, A., Cimaz, R., De Palma, R., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Cosmi, L.,Annunziato, F. (2012). Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *Eur J Immunol* 42, 3180-3188.
 36. Nestle, F. O., Kaplan, D. H.,Barker, J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496-509.
 37. Nickoloff, B. J. (1991). The cytokine network in psoriasis. *Arch Dermatol* 127, 871-884.
 38. Popovic, K., Ek, M., Espinosa, A., Padyukov, L., Harris, H. E., Wahren-Herlenius, M.,Nyberg, F. (2005). Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52, 3639-3645.
 39. Scaffidi, P., Misteli, T.,Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
 40. Semino, C., Angelini, G., Poggi, A.,Rubartelli, A. (2005). NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106, 609-616.
 41. Seong, S. Y.,Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 4, 469-478.
 42. Shi, Y., Sandoghchian Shotorbani, S., Su, Z., Liu, Y., Tong, J., Zheng, D., Chen, J., Liu, Y., Xu, Y.,Jiao, Z. (2011). Enhanced HMGB1 expression may contribute to Th17 cells activation in rheumatoid arthritis. *Clinical and Developmental Immunology* 2012
 43. Shi, Y., Sandoghchian Shotorbani, S., Su, Z., Liu, Y., Tong, J., Zheng, D., Chen, J., Liu, Y., Xu, Y., Jiao, Z., Wang, S., Lu, L., Huang, X.,Xu, H. (2012). Enhanced HMGB1 expression may contribute to Th17 cells activation in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2012, 295081.
 44. Stockinger, B.,Veldhoen, M. (2007). Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 19, 281-286.

45. Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H., Nakagawara, A. (2002). HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem* 277, 7157-7164.
46. Su, Y. S., Yu, H. S., Li, W. C., Ko, Y. C., Chen, G. S., Wu, C. S., Lu, Y. W., Yang, Y. H., Lan, C. C. (2013). Psoriasis as initiator or amplifier of the systemic inflammatory march: impact on development of severe vascular events and implications for treatment strategy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27, 876-883.
47. Su, Z., Sun, C., Zhou, C., Liu, Y., Zhu, H., Sandoghchian, S., Zheng, D., Peng, T., Zhang, Y., Jiao, Z., Wang, S., Xu, H. (2011). HMGB1 blockade attenuates experimental autoimmune myocarditis and suppresses Th17-cell expansion. *Eur J Immunol* 41, 3586-3595.
48. Sundberg, E., Grundtman, C., Af Klint, E., Lindberg, J., Ernestam, S., Ulfgren, A. K., Harris, H. E., Andersson, U. (2008). Systemic TNF blockade does not modulate synovial expression of the pro-inflammatory mediator HMGB1 in rheumatoid arthritis patients--a prospective clinical study. *Arthritis Res Ther* 10, R33.
49. Swindell, W. R., Xing, X., Stuart, P. E., Chen, C. S., Aphale, A., Nair, R. P., Voorhees, J. J., Elder, J. T., Johnston, A., Gudjonsson, J. E. (2012). Heterogeneity of inflammatory and cytokine networks in chronic plaque psoriasis. *PLoS One* 7, e34594.
50. Urbonaviciute, V., Furnrohr, B. G., Weber, C., Haslbeck, M., Wilhelm, S., Herrmann, M., Voll, R. E. (2007). Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J Leukoc Biol* 81, 67-74.
51. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388-400.
52. Walker, J. M., Gooderham, K., Hastings, J. R., Mayes, E., Johns, E. W. (1980). The primary structures of non-histone chromosomal proteins HMG 1 and 2. *FEBS Lett* 122, 264-270.
53. Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A., Tracey, K. J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248-251.
54. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25, 821-852.
55. West, K. L., Castellini, M. A., Duncan, M. K., Bustin, M. (2004). Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol Cell Biol* 24, 3747-3756.
56. Xu, Y. J., Li, L., Chen, Y., Fu, B., Wu, D. S., Li, X. L., Zhao, X. L., Chen, F. P. (2015). Role of HMGB1 in regulation of STAT3 expression in CD4(+) T cells from patients with aGVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 161, 278-283.
57. Yoshizaki, A., Komura, K., Iwata, Y., Ogawa, F., Hara, T., Muroi, E., Takenaka, M., Shimizu, K., Hasegawa, M., Fujimoto, M., Sato, S. (2009). Clinical significance of serum HMGB-1 and sRAGE levels in systemic sclerosis: association with disease severity. *J Clin Immunol* 29, 180-189.

58. Zeh, H. J., 3rd, Lotze, M. T. (2005). Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother* 28, 1-9.
59. Zhang, W., Guo, S., Li, B., Liu, L., Ge, R., Cao, T., Wang, H., Gao, T., Wang, G., Li, C. (2017). Proinflammatory effect of high-mobility group protein B1 on keratinocytes: an autocrine mechanism underlying psoriasis development. *J Pathol* 241, 392-404.

Abkürzungsverzeichnis

HMGB1	High Mobility Group Box 1
IFN γ	Interferon γ
PASI	Psoriasis Area Severity Index
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
TGF β	Tumor Growth Faktor β
Th17	T Helfer 17 Zellen
Th1	T Helfer 1 Zellen
Th2	T Helfer 2 Zellen
Th Zellen	T Helfer Zellen
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tregs	regulatorische T Zellen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Psoriatische Plaques an der Streckseite der unteren Extremitäten, Quelle: (Health.com, 2017)	7
Abbildung 2: Circulus vitiosus der Psoriasis vulgaris, Quelle: (Lynde et al., 2014)	8
Abbildung 3: Immunpathogenese der Psoriasis vulgaris, Quelle: (Di Meglio et al., 2011)..	9
Abbildung 4: HMGB1 im Immunsystem, Quelle: (Lotze et al., 2005).....	13
Abbildung 5: HMGB1 im Serum	29
Abbildung 6: HMGB1 im Serum unter verschiedenen Therapien	30
Abbildung 7: HMGB1 im Serum mit und ohne Therapie	30
Abbildung 8: IL-23 im Serum	32
Abbildung 9: TGF- β im Serum	34
Abbildung 10: HMGB1 in der Dermis	36
Abbildung 11: IL-17 und CD3 in der Dermis	38
Abbildung 12: ROR γ T in CD4 ⁺ Tregs und CD4 ⁺ T Zellen	42
Abbildung 13: CCR6+IL-23R ⁺ in CD4 ⁺ Tregs und CD4 ⁺ T Zellen	43
Abbildung 14: Expression von RAGE auf der Oberfläche aller Immunzellen, CD8 ⁺ T Zellen, CD4 ⁺ T Zellen und CD4 ⁺ Tregs.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Antikörper	18
Tabelle 2: Patientenmaterial zur Auswertung der Blutseren	19
Tabelle 3: Systemische Therapien der Patienten	19
Tabelle 4: Patientendaten für die Immunhistochemie	20
Tabelle 5: Patientendaten für die Immunzellphänotypisierung	20

Anhang

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich zunächst bei Herrn PD Dr. Andreas Körber und Herrn PD Dr. Christoph Bergmann für die Überlassung des Themas, die überaus engagierte und inspirierende Betreuung und die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge bei dieser Arbeit, sowie weiteren wissenschaftlichen Projekten. Vielen Dank an das Labor-Team von Frau Prof. Dr. Annette Paschen und Frau Antje Sucker, welche mir bei der Probensammlung, Aufarbeitung und Durchführung der ELISAs behilflich waren.

Ein großer Dank geht auch an das Promotionskolleg ELAN, an die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und insbesondere an Frau Prof. Dr. Rauen für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung meines Promotionsprojektes. Die Möglichkeit an Kongressen und Tagungen teilzunehmen, sowie an der Radboud Universität in Nimwegen und der University of Pittsburgh in Pennsylvania forschen zu können, waren sehr wertvolle Erfahrungen.

In Nimwegen wurde ich außerordentlich gut von Frau Prof. Dr. Irma Joosten und Herrn PD Dr. Hans Koenen betreut. Bei Fragen bezüglich der Datenauswertung, der wissenschaftlichen Einordnung und der Anfertigung der Publikationen standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Auch im Labor erfuhr ich eine großartige Unterstützung durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter Esther Fasse, Esther van Rijssen und Bram van Cranenbroek, vielen Dank.

In Pittsburgh wurde ich sehr herzlich von Prof. Dr. Michael Lotze betreut, welcher mir verschiedene wissenschaftliche Herangehensweisen näherbrachte und auch ein amerikanisch-deutsches Oktoberfest für mich organisierte.

Außerhalb der Universität, danke ich in besonderem Maße meinen Eltern für die Geduld und ihre nicht nur finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums. Sowie meiner Schwester Eva, die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.